ISSN 0370-5404

Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán
Tomo 92 (2): 33-38; 2015

Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados

Canseco Grellet María Alejandra*, Juan Luis Aráoz Martínez*, Carlos Gusils*/** y Silvia Zossi*

RESUMEN

Es importante disponer de un método para cuantificar bajas concentraciones de azúcares reductores totales al final del proceso de fermentación alcohólica. El objetivo de este estudio fue adaptar y validar la metodología basada en el uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico para la determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. Se determinaron los límites de detección y cuantificación, linealidad, sesgo e incertidumbre expandida relativa. Los resultados mostraron que este método es válido para determinar la concentración de azúcar residual en la fermentación alcohólica en un rango entre 0,08 mg/ml y 1,2 mg/ml, con una incertidumbre expandida de ± 13,98%.

Palabras clave: ácido 3,5-dinitrosalicílico, fermentación alcohólica, método colorimétrico.

ABSTRACT
VALIDATION OF A METHODOLOGY TO DETERMINE REDUCING TOTAL SUGARS IN FERMENTED WINES

It is important to have a method to quantify low concentrations of total reducing sugars at the end of the fermentation process. The aim of this study was to adapt and validate the methodology based on the use of 3,5-dinitrosalicylic acid for determination of total reducing sugars in fermented wines. Limits of detection and quantification, linearity, bias and relative expanded uncertainty were determined. The results showed that this method is valid to determine the concentration of residual sugar in the alcoholic fermentation in a range between 0.08 mg ml^{-1} and 1.2 mg ml^{-1}, with an expanded uncertainty of ± 13.98.

Key words: 3,5-dinitrosalicylic acid, alcoholic fermentation, colorimetric method.

** Sección Química de los Productos Agroindustriales, EEAOC.*
*** CONICET.*

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de métodos analíticos es esencial en el seguimiento y control del proceso de fabricación de azúcar y alcohol (Bello Gil *et al*., 2006). Para poder evaluar el proceso de fermentación alcohólica y realizar el cálculo de rendimiento industrial es importante la cuantificación de los azúcares reductores (glucosa, maltosa, maltotriosa, maltopentosa y dextrinas, entre otros) en todo el sistema. González Blair *et al*. (2003) describen que existen numerosas metodologías para llevarla a cabo, desde técnicas volumétricas a cromatográficas, incluyendo métodos colorimétricos.

Los métodos del ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) y Somogyi-Nelson son los más comúnmente usados para la determinación espectrofotométrica de azúcares reductores, donde la principal ventaja que poseen radica en la alta sensibilidad (Akbar *et al*., 2006).

El método del ADNS se basa en una reacción entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, donde se produce la reducción del mismo en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, resultando en un complejo de color naranja cuantificable colorimétricamente (Akbar *et al*., 2006).

El objetivo de este trabajo fue validar, bajo las condiciones del laboratorio de la Sección Química de la EEAOC, la metodología basada en la utilización de ácido 3,5–dinitrosalicílico para la determinación de azúcares reductores totales (ART) en vinos fermentados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación de ART por la metodología del ADNS se siguió la técnica descripta por Reis (2011).

Para la preparación del reactivo se pesaron por separado: 5 g de ácido 3,5- dinitrosalicílico, que se disolvieron en 150 ml de agua destilada a 45°C (solución A); separadamente se pesaron 150 g de tartrato de sodio y potasio que se disolvieron en 100 ml de solución de NaOH 2N (recién preparada) calentada a 40°C (solución B). Se mezclaron ambas soluciones y se llevó a volumen de 500 ml.

La inversión de las muestras de vino consistió en colocar 1 ml de estas, 30 ml de agua destilada y 2,5 ml de ácido clorhídrico concentrado en matraces aforados de 100 ml, y su posterior calentamiento en baño maría a 65°C por 15 minutos. Luego del enfriamiento de las muestras, se neutralizaron mediante la adición de NaOH (12 N) y se llevaron a volumen con agua destilada.

Se transfirió 1 ml de las muestras tratadas a tubos de ensayo, donde se adicionaron 1 ml de solución de ADNS y 1 ml de agua destilada. Las muestras se calentaron a ebullición por cinco minutos y se enfriaron en corriente de agua. Posteriormente se adicionaron 5 ml de agua destilada en cada tubo, se homogeneizaron en un agitador tipo vórtex y se realizaron las lecturas de absorbancia a 540 nm en espectofotómetro UV–Visible Hewlett Packard con arreglo de diodos, modelo 8452A. Idéntico procedimiento se realizó utilizando agua en lugar de la muestra para obtener el blanco de reactivos.

Empleando una curva patrón de glucosa se pudo cuantificar los ART, para lo cual se emplearon soluciones patrones por triplicado de concentraciones de glucosa monohidratada (99,5%), marca Fluka, comprendidas entre 0,06 mg/ml y 1,2 mg/ml, previamente secada en desecador con sílica gel. Se preparó inicialmente una solución patrón de 6 mg/ml y a partir de ella se realizaron diluciones con agua destilada de conductividad menor que 5 µS/cm. Para la lectura de la absorbancia, se siguió el procedimiento descrito anteriormente. La linealidad se analizó mediante regresión lineal y se obtuvo la ecuación de correlación.

Para llevar a cabo la validación se prepararon soluciones patrones de glucosa en el intervalo de concentraciones mencionado. Se determinaron precisión (en condiciones de repetibilidad), límites de detección y cuantificación, error porcentual (E%) y límites de confianza (LC). Esto fue realizado por dos analistas, durante siete días, trabajando bajo las mismas condiciones (equipos, soluciones, etc.) (Zossi *et al*., 2008).

Para establecer los límites de detección y cuantificación, el laboratorio de la Sección Química adoptó el criterio de establecer, para el primero, la mínima concentración obtenida en condiciones de repetibilidad, donde el coeficiente de variación porcentual (CV%) sea menor o igual a 10%, sin tener en cuenta el error porcentual (E%); para el segundo, se adoptó el criterio de establecer como límites de cuantificación la menor concentración obtenida en condiciones de repetibilidad, donde CV% y E% sean menores o iguales al 10%.

Para evaluar la precisión del método en condiciones de repetibilidad se analizaron tres muestras de vinos fermentados de una industria.

Para evaluar la precisión en condiciones de precisión intermedia se emplearon tres muestras de vinos fermentados fortificados con 0,31 mg/ml y 0,75 mg/ml de glucosa. Estas muestras se analizaron durante siete días y se calcularon las recuperaciones obtenidas para las dos fortificaciones (referidos al valor teórico) y se calcularon DE, CV % y el LC al 95%.

El sesgo del método se determinó en términos de error relativo y de recuperación del analito (Sanchez Martínez, 2005). El primero se obtuvo en condiciones de repetibilidad para cada solución patrón de glucosa utilizada en el rango seleccionado (Tabla 1), y la recuperación se calculó en base a la evaluación de una muestra suplementada con dos niveles (0,31 mg/ml y 0,71 mg/ml).

Para determinar la incertidumbre se empleó una evaluación de tipo A (Gor y Ruiz, 2006), aplicando la ecuación 1:

Tabla 1. Estudios estadísticos de soluciones patrones de glucosa en condición de repetibilidad.

Valor Teórico		Glucosa (mg/ml)								
		0,06	0,08	0,10	0,12	0,30	0,48	0,66	0,84	1,20
Analista 1	Día 1	0,07	0,08	0,09	0,13	0,29	0,49	0,67	0,85	1,24
	Día 2	0,07	0,08	0,08	0,14	0,32	0,51	0,72	0,86	1,25
	Día 3	0,07	0,08	0,09	0,14	0,31	0,51	0,71	0,90	1,27
	Día 4	0,07	0,08	0,10	0,13	0,31	0,51	0,68	0,88	1,27
	Día 5	0,07	0,09	0,09	0,13	0,30	0,49	0,68	0,87	1,23
	Día 6	0,07	0,09	0,10	0,12	0,28	0,47	0,65	0,84	1,21
	Día 7	0,07	0,07	0,10	0,14	0,28	0,48	0,66	0,86	1,20
Analista 2	Día 1	0,08	0,08	0,09	0,14	0,30	0,48	0,67	0,87	1,23
	Día 2	0,08	0,08	0,09	0,14	0,31	0,50	0,68	0,86	1,23
	Día 3	0,07	0,08	0,08	0,14	0,25	0,48	0,66	0,84	1,21
	Día 4	0,08	0,08	0,09	0,12	0,29	0,48	0,63	0,86	1,22
	Día 5	0,07	0,08	0,09	0,12	0,28	0,47	0,65	0,83	1,20
	Día 6	0,07	0,08	0,10	0,13	0,30	0,49	0,69	0,87	1,23
	Día 7	0,03*	0,08	0,09	0,13	0,30	0,50	0,69	0,88	1,27
	Promedio	**0,07**	**0,08**	**0,09**	**0,13**	**0,29**	**0,49**	**0,67**	**0,86**	**1,24**
	DE	**0,00**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
	CV (%)	**2,95**	**7,95**	**6,85**	**5,87**	**6,17**	**2,94**	**3,37**	**2,14**	**1,47**
	E (%)	**22,47**	**0,11**	**8,02**	**9,47**	**1,91**	**2,28**	**2,26**	**2,75**	**3,63**
	LC al 95%	**0**	**0**	**0**	**0**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**

*se eliminó el valor mediante el test de Grubbs

$$U_c = \sqrt{\mu_1^2 + \mu_2^2 + \mu_3^2}$$

Ecuación 1

Siendo Uc la incertidumbre combinada; μ1 y μ2 la incertidumbre estándar en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, respectivamente; y μ3, la incertidumbre estándar del sesgo en condiciones de repetibilidad. Las mismas se calcularon empleando las ecuaciones 3, 4 y 5:

$$\mu_1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(CV^2_{repetitividad}\right)}{n}}$$

Ecuación 2

$$\mu_2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(CV^2_{reproducibilidad}\right)}{n}}$$

Ecuación 3

$$\mu_3 = \text{Promedio } E\%$$

Ecuación 4

$$U_e = k \cdot U_c$$

Ecuación 5

donde n es el número de repeticiones analizadas para cada caso.

Los ensayos fueron realizados en un laboratorio certificado con equipos calibrados y/o verificados. El espectofotómetro UV–Visible fue verificado con referencias trazables al Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST – Estados Unidos).

Para el estudio se trabajó con material de vidrio (matraces, pipetas) clase A y los parámetros que se validaron fueron: límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), linealidad e intervalo operativo, precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, sesgo evaluado como error porcentual y recuperación, e incertidumbre relativa expandida.

Las herramientas estadísticas que se utilizaron fueron:

- Test t de Student
- Test de Grubbs para la selección de datos
- ANOVA
- Test F

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se graficó la absorbancia en función de la concentración de glucosa, obteniendo así la ecuación de la recta; se analizó la linealidad y el intervalo operativo de este método. Mediante el test F se comprobó la homocedasticidad de la varianza en todo el intervalo. Empleando regresión lineal se obtuvo la ecuación de correlación, con un coeficiente (R^2=) igual a 0,9975. El cálculo del %ART se realizó mediante la ecuación (6):

$$\%ART\ (g/100ml) = (1{,}6741 \times A_{540nm} + 0{,}0778) \times 10$$

Ecuación 6

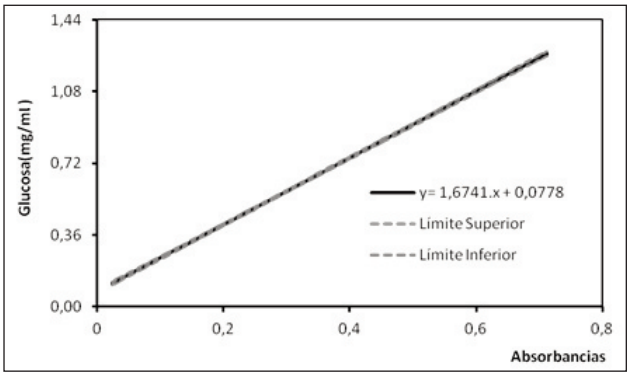

Figura 1: Curva de calibración y límites de confianza.

Tabla 2. Estudio estadístico en tres muestras de vino en condiciones de repetibilidad

Muestras		% ART (g/100ml)		
		1	2	3
Analista 1	Día 1	2,20	10,30	8,70
	Día 2	2,39	9,04	8,69
	Día 3	2,46	8,82	8,59
	Día 4	2,22	8,92	8,67
	Día 5	2,48	8,62	8,58
	Día 6	2,39	9,14	8,97
	Día 7	2,30	9,19	8,69
Analista 2	Día 1	1,93	9,22	8,98
	Día 2	2,08	9,39	8,41
	Día 3	2,19	8,91	9,42
	Día 4	2,08	8,88	8,97
	Día 5	2,04	9,19	8,78
	Día 6	2,13	8,64	8,82
	Día 7	2,13	8,70	9,17
Promedio		2,22	9,07	8,82
DE		0,17	0,43	0,26
CV (%)		7,61	4,69	2,99
LC al 95%		0,09	0,23	0,14

De la Tabla 1, al realizar el estudio estadístico de las soluciones patrones de glucosa en condiciones de repetibilidad, se obtuvieron los límites de detección y cuantificación correspondientes a valores de concentraciones de glucosa de 0,06 mg/ml y 0,08 mg/ml, respectivamente. De esta manera el intervalo de trabajo quedó establecido entre 0,08 mg/ml – 1,2 mg/ml.

Para evaluar la precisión del método se analizaron tres muestras de vinos fermentados de una industria. En la Tabla 2 se observa que la metodología empleada para la determinación de glucosa en condiciones de repetibilidad presentan condiciones aceptables de precisión en términos de repetibilidad, con coeficientes de variación porcentual menores a 10, según lo establecido por Zossi *et al*. (2008).

Los resultados obtenidos en condiciones de precisión intermedia se representan en la Tabla 3.

Basado en experiencia y antecedentes en el laboratorio, se estableció que una variación de ±10% de los valores de recuperación son considerados adecuados en el rango de concentración analizado.

Al analizar el sesgo, se determinó que para el intervalo de trabajo comprendido entre 0,08 mg/ml y 1,2 mg/ml, el error porcentual es menor al 10%, lo que indica que el método es confiable en dicho intervalo y no presenta sesgos en la cuantificación de las diferentes concentraciones (Tabla 1).

El proceso de medición involucra necesariamente el uso de instrumentos, y estos siempre tienen asociada una incertidumbre que a su vez se relaciona con la resolución de dicho instrumento. Pero se puede aspirar a proponer un rango de valores dentro del cual debe encontrarse el valor real. Las dos formas más comunes de expresar este rango es mediante un intervalo determinado, un valor mínimo límite y un valor máximo límite [x_{min}-x_{max}] o como un valor central ± una incertidumbre.

Para el cálculo de la incertidumbre se utilizaron los datos de las Tablas 2 y 3 en las ecuaciones 2 y 3, se obtuvieron los valores de μ1 = 5,44 y μ2 = 2,19. Con los valores de la Tabla 1 se obtuvo μ3 = 3,80.

De esta manera, la incertidumbre combinada del método, calculada mediante la ecuación 1, resultó igual a 6,99%. Al emplear este dato en la ecuación 5 con un factor de cobertura (k) igual a 2, se obtuvo una incertidumbre expandida de 13,98% para el intervalo de trabajo comprendido entre 0,08 mg/ml – 1,2 mg/ml de ART en vino fermentado.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de los parámetros determinados se puede concluir que cumplen con las condiciones establecidas por el Laboratorio de la Sección Química de la EEAOC para la validación de un método analítico de estas características (Zossi *et al*.,

Tabla 3. Porcentajes de glucosa recuperados en muestras de vinos con dos niveles de fortificación (0,31 y 0,75 mg/ml de glucosa)

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Concentración Teórica (mg/ml) de la muestra					
	0,53	0,97	1,24	1,68	1,21	1,65
Día 1	99,59	107,49	107,09	99,27	105,27	104,47
Día 2	106,21	106,97	106,58	98,29	108,56	103,64
Día 3	103,00	108,49	109,24	95,28	106,05	98,72
Día 4	104,37	104,61	106,86	99,50	106,54	106,03
Día 5	105,25	107,19	104,07	97,61	102,16	102,72
Día 6	103,98	109,59	105,71	102,67	106,13	102,23
Día 7	107,75	104,09	103,31	99,27	105,85	98,75
Promedio	**104,31**	**106,92**	**106,12**	**98,84**	**105,79**	**102,37**
DE	**2,60**	**1,97**	**1,99**	**2,24**	**1,91**	**2,77**
CV (%)	**2,49**	**1,85**	**1,87**	**2,26**	**1,80**	**2,70**
LC al 95%	**1,96**	**1,49**	**1,50**	**1,69**	**1,44**	**2,09**

2008). Se determinó la incertidumbre relativa expandida, resultando igual a ± 13,98 % para el intervalo de trabajo validado comprendido entre 0,08 mg y 1,2 mg de glucosa por ml de vino fermentado.

Las cualidades a destacar del método son su simpleza analítica, bajo tiempo de ejecución y bajos requerimientos de reactivos químicos, lo que se traduce finalmente en una ventaja económica.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Akbar, A.; S. Sinegani and G. Emtiazi. 2006. The relative effects of some elements on the DNS method in cellulase assay. J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 10 (3): 93- 96

Bello Gil, D.; E. Carrera Bocourt y Y. Díaz Maqueira. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 40 (2): 45-50.

González Blair, G. H. y Ó. F. Castellanos Domínguez. 2003. Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. Revista Ingeniería E Investigación 52: 5–17.

Gor, S. y M. Ruiz. 2006. Curso Validación de técnicas analíticas de ensayos. Universidad Nacional de Tucumán, 29 de septiembre y 6 al 8 de octubre.

Reis, V.R. 2011. Caracterizaçao de linhagens selvagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. Escola Superior de Agricultura ¨Luiz de Queiroz¨. Universidad de Sao Paulo. Piracicaba

Sanchez Martinez, D. L. 2005. Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinos térreos (calcio y magnesio) por volumetría EDTA. Disponible en: http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes

Zossi, B. S.; M. E. Navarro; N. Sorol; M. Sastre y R. M. Ruiz. 2008. Validación de una metodología para determinar el contenido de almidón en azúcar. Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán 85 (2): 1-7.