

VALIDACIÓN E INCERTIDUMBRE EN DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS MEDIANTE DOS MÉTODOS

J. Heras Roger¹ y C. Muñoz Darías

¹ Laboratorio Insular de Vinos, Cabildo de Tenerife, C/Teobaldo Power nº9, Güímar. Tenerife, España. E-mail: jesushr@tenerife.es

ÁREA TEMÁTICA. REQUISITOS TÉCNICOS

RESUMEN. El presente artículo detalla la validación y cálculo de incertidumbre de una determinación enzimática secuencial mediante dos métodos, tanto utilizando vinos certificados como materiales de referencia (MRE) y repeticiones de muestras aleatorias como a través del procedimiento comparativo por pares de valores. En este caso a partir de resultados procedentes de ensayos de intercomparación en la misma matriz. La incertidumbre combinada y expandida obtenida por ambos métodos es similar y muy baja en términos relativos (<8%). La técnica enzimática estudiada resulta rápida y fiable independientemente del kit de reactivo enzimático utilizado.

PALABRAS CLAVE. Validación, incertidumbre, ácido acético, vinos.

1.- Introducción

El uso de determinaciones enzimáticas para la cuantificación de diversos analitos se encuentra muy extendido, tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria; puesto que dichas técnicas permiten una cuantificación rápida y fiable, aplicándose bajos límites de detección y cuantificación pero alta especificidad.

Tradicionalmente las enzimas han sido utilizadas en análisis clínicos para determinaciones como el colesterol, o la bilirrubina; si bien en los últimos años también se ha generalizado su uso en análisis de alimentos dada su alta fiabilidad y precisión.

El presente estudio se ha realizado utilizando kits enzimáticos específicos para alimentos, pero aplicados en un instrumento de análisis clínicos; de tal forma que aunque todos los datos se refieren al contenido de ácido acético en vinos, el protocolo de cálculo y validación sería análogo en el caso de otras sustancias cuyo análisis se realizara por vía enzimática secuencial.

La matriz que nos ocupa, el vino, se define como un producto obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica del mosto de uva. Es un alimento muy complejo desde el punto de vista fisicoquímico puesto que sufre una transformación debida a la actividad microbiana. Existen más de seiscientos componentes descritos en el vino, no solo producidos por reacciones orgánicas, sino también con

los envases, como puede ser la madera, en los que se dan fenómenos bioquímicos y enzimáticos, que son resultado de la presencia de componentes dinámicos.

El ácido acético es un componente cuya determinación es primordial en este producto, apareciendo principalmente como consecuencia de la actividad de las bacterias acéticas así como por vías de formación compartidas con el ácido láctico.

Tradicionalmente el sector enológico ha englobado este componente dentro de la acidez volátil, definiéndose ésta como el conjunto de ácidos grasos volátiles que se hallan en el vino, ya sean disociados o no. En esta definición se excluyen explícitamente los ácidos láctico y succínico, el ácido carbónico y el SO₂ libre y combinado.

Habitualmente dicha acidez volátil se expresa en g/l de ácido acético y normalmente la cantidad varía desde 0,2 a 0,6 g/l, aunque no se aprecia fácilmente al paladar hasta valores de 1 g/l. Es uno de los pocos componentes del vino que poseen un máximo legal, impuesto por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.), que corresponde a 1,2 g/l expresados en ácido acético, siempre que el vino tenga más de 13% de grado alc. Vol y se trate de vino tinto.

Dado que el ácido acético es el componente mayoritario de la acidez volátil suele utilizarse la evaluación de éste compuesto en exclusiva para conocer el estado sanitario del vino, por lo que es importante determinarlo correctamente. Si el contenido en ácido acético es muy elevado, esto indica la alteración y la incorrecta elaboración o cuidado del vino, provocando que el vino se pique y avinagre con el paso del tiempo; por consiguiente es conveniente que su contenido sea lo más bajo posible. De esta manera dicho compuesto se utiliza como marcador rápido del deterioro del vino, variando los límites legales según la región y el tipo de producto final.

En la presente comunicación se ha optado por el estudio de la incertidumbre de un método enzimático secuencial donde un pequeño volumen de muestra de vino (3 µl) reacciona con un reactivo enzimático sensible al ácido acético (~350 µl) teniendo lugar una serie de reacciones pertenecientes al ciclo del ácido cítrico.

La medida fotométrica de la reducción de NAD⁺ a NADH indica la cantidad de ácido acético presente en la muestra, utilizando la longitud de onda de 340nm y una temperatura constante de 37°C. Previamente debe obtenerse una correcta recta de calibrado que permita estimar, con la

incertidumbre adecuada, la concentración de ácido acético en la muestra.

2.- Materiales y métodos

Las muestras de vino fueron previamente desgasificadas para eliminar posibles interferencias debidas al ácido carbónico, igualmente se evitaron muestras de gran turbidez o contenido polifenólico, puesto que entonces sería necesario tratarlas previamente con PVPP y filtrarlas.

Para la cuantificación del ácido acético por vía enzimática secuencial se utilizó el dispositivo LISA200 de HYCEL Diagnostics adaptado para su uso en la industria enológica. Se utilizaron 2 tipos de reactivos enzimáticos comerciales diferentes, ambos basados en la absorbancia a 340 nm derivada de reacciones específicas para el ácido acético, cuya cuantificación final conllevara la transformación de NADH a NAD⁺. Los cálculos relativos a la validación posterior se realizaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos por ambos reactivos indistintamente, con objeto de representar fielmente las condiciones de un laboratorio de trabajo donde se utilicen dos proveedores para una misma determinación enzimática.

Cabe destacar que los resultados obtenidos con ambos reactivos resultaron siempre comparables, siendo sus pendientes muy cercanas a la unidad y la ordenada en el origen cercana a 0, si bien las absorbancias obtenidas si fueron fácilmente diferenciables. El mecanismo enzimático de cada uno de los reactivos considerados se describe a continuación:

Tabla 1. Reacciones enzimáticas implicadas en cada reactivo

Tecnología Difusión Ibérica	Biosystems
1) El ácido acético, en forma de acetato, reacciona con el adenosin-5-trifosfato (ATP) y coenzima A (CoA) en presencia de acetil CoA-sintetasa (ACS) para convertirse en acetil-CoA. <i>Acetato+ATP+CoA→ acetilCoA+AMP+pirofosfato</i>	1) El ácido acético, en forma de acetato, reacciona con adenosin-5-trifosfato (ATP) en presencia de la enzima Acetato Kinasa (AK) para producir adenosin-difosfato (ADP) y Acetilfosfato. <i>Acetato+ATP→ acetilfosfato+ADP</i>
2) El acetil-CoA producido anteriormente reacciona con el oxalacetato en presencia de citrosintetasa (CS) para producir citrato y coenzima A (CoA). <i>acetilCoA+oxalacetato+H₂O→ CoA+Citrato</i>	2) El ADP producido reacciona con el fosfoenolpiruvato en presencia de la enzima Piruvato Kinasa (PK) produciendo piruvato y ATP. <i>ADP+fosfoenolpiruvato→ ATP+Piruvato</i>
3) El oxalato necesario para efectuar la reacción 2 proviene del L-malato que reacciona con nicotinamida adenina (NAD ⁺) por medio de la enzima L-malato deshidrogenasa, alcanzándose un máximo de absorción a 340nm. <i>L-malato+NAD⁺→ oxalacetato+NADH+H⁺</i>	3) El piruvato formado en la reacción anterior reacciona con NAHD en presencia de la enzima D-lactato deshidrogenasa para producir lactato y NAD, cuya absorbancia a 340 nm nos permite la cuantificación final. <i>Piruvato+β-NADH→ Lactato+β-NAD</i>

La calibración para ambos reactivos se realizó a partir de 5 puntos, de 0,25 hasta 1,25 g/l de ácido acético con dos medidas para cada punto y el blanco (0-0,25-0,50-0,75-1,00-1,25 g/l) preparados a partir de ácido acético glacial.

Para el cálculo de incertidumbre asociado a dicha determinación se tomaron 2 vías diferentes, la primera basándonos en repeticiones de material de referencia certificado y muestras de laboratorio, y la segunda teniendo en cuenta los resultados enviados por el laboratorio a ejercicios de intercomparación de reconocido prestigio.

2.1 Estimación de la incertidumbre usando vinos MRE

Para este método partimos de muestras de referencia cuyos valores son conocidos y tienen una incertidumbre estimada en el certificado. Se realizaron 10 experimentos de medición para 4 rangos de medida, en los que varían todas aquellas magnitudes (personal, equipos, reactivos, fungibles, material, etc...) que puedan afectar a nuestro resultado. Con dichos valores de MRE se obtienen valores de media aritmética media y desviación estándar para el conjunto de resultados obtenidos.

Igualmente se realizaron 10 medidas de muestras diferentes a los vinos de referencia (MRE) cuyos valores fueran similares para estimar la incertidumbre debida a la repetibilidad del método. De manera similar se estimaron los límites de detección y cuantificación, previa determinación de 10 ensayos con agua destilada en días diferentes y con calibraciones diversas.

En primer lugar se comprobó que no existían diferencias significativas entre el valor medio obtenido por nuestro laboratorio y el valor certificado de los patrones, utilizando el Índice de Compatibilidad (IC).

$$IC = \frac{|V_C - V_M|}{\sqrt{u_p^2 + \left(\frac{S_{VM}}{\sqrt{n}}\right)^2}} \leq 2 \tag{1}$$

donde:

- V_C = Valor del patrón certificado.
- V_M = Valor medio de los experimentos.
- U_p = Incertidumbre combinada del patrón.
- S_{VM} = Desviación estándar obtenida.
- n = Número de repeticiones realizadas.

La incertidumbre obtenida para nuestros valores de MRE en el laboratorio, usando indistintamente ambos reactivos, constaría de las siguientes componentes:

-Debida al valor del MRE:

$$U_p = \frac{u_{VC}}{k} \tag{2}$$

Los grados de libertad dependerán de lo indicado en el certificado. Si K=2, grados de libertad infinitos.

-Debida a la determinación del valor medio:

$$U_{VM} = \frac{S_{VM}}{\sqrt{n}} \tag{3}$$

Los grados de libertad dependerán del número de repeticiones (n-1).

-Debida a la realización de la medida cada vez:

$$U_M = \frac{S_M}{\sqrt{n_M}} \quad (4)$$

donde:

n_M = nº de repeticiones que se realizan de una muestra diferente al patrón pero con un valor cercano, y

S_M = desviación estándar de reproducibilidad de dichas muestras, siendo los grados de libertad el número de veces que se repitió la muestra menos uno.

-Debida a la corrección:

En caso de que la corrección sea estadísticamente significativa ($IC > 2$) y no se aplique a los resultados, existirá un cuarto componente de incertidumbre:

$$U_{CORR} = \frac{\text{Corrección}}{\sqrt{3}} \quad (5)$$

Con grados de libertad infinitos al tratarse de una distribución rectangular.

De esta manera el cálculo final de incertidumbre será:

$$U = \sqrt{U_P^2 + U_{VM}^2 + U_M^2 + U_{CORR}^2} \quad (6)$$

$$I = K \cdot U \quad (7)$$

El valor de K dependerá de los grados de libertad existentes, y de la forma de la distribución.

2.2 Estimación de la incertidumbre usando resultados procedentes de interlaboratorios

En el caso de la estimación de incertidumbre utilizando resultados enviados por el laboratorio a ensayos de intercomparación deben calcularse en primer lugar las diferencias entre pares de valores según la siguiente tabla:

Tabla 2. Validación por pares de valores

Valor referencia interlaboratorio	Valor obtenido por el laboratorio	Diferencias d_i	Exactitudes E_i
V_{R1}	V_1	$d_1 = V_{R1} - V_1$	D_1/V_{R1}
V_{R2}	V_2	$d_2 = V_{R2} - V_2$	D_2/V_{R2}
...
V_{Rn}	V_n	$d_n = V_{Rn} - V_n$	d_n/V_{Rn}

Una vez relacionados los resultados por pares de valores se calcula la media de las diferencias y se aplica el test t:

$$t_{cal} = \frac{\bar{d}}{S_d / \sqrt{n}} \quad (8)$$

Si la t tabulada es mayor que la t calculada, podemos decir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los pares de resultados y por consiguiente resultan comparables.

Para conocer la exactitud del método ésta se calculará a partir de los resultados de dividir las diferencias, d_i , entre el valor de referencia, V_{Ri} , y obteniendo la media de éstas:

$$E = \frac{\sum \frac{d_i}{V_{Ri}}}{n} \quad (9)$$

donde:

n = número de pares de valores empleados en el estudio, en nuestro caso 10.

Por otro lado, la precisión en términos de reproducibilidad se obtiene como la desviación estándar de las exactitudes:

$$R = \text{Desvest}(E_i) \quad (10)$$

Si se observa que los pares de valores con los que contamos pertenecen a distintos niveles de valores, pueden agruparse éstos primeramente por tramos y aplicarse el proceso en cada tramo.

La estimación de la incertidumbre caja negra para validar métodos por ensayos de intercomparación se basa en una extrapolación de la fórmula de estimación de los datos obtenidos.

$$U_C = \sqrt{U_{VRef}^2 + U_{media}^2 + U_{repro}^2 + U_{CORR}^2} \quad (11)$$

La obtención de los valores de cada una de las contribuciones en el caso de validación por pares de valores obtenidos en ejercicios de intercomparación es el siguiente:

- U_{VRef} : Se obtiene a partir de las incertidumbres del valor de referencia, siendo cada una calculada a partir de los resultados de cada interlaboratorio según la fórmula siguiente:

$$U_{V_{Ri}} = \frac{S_{V_{Ri}}}{\sqrt{n_{Ri}}} \quad (12)$$

donde:

n_{Ri} = número de participantes y la suma debe componerse como suma cuadrática:

$$U_{VRef} = \sqrt{\frac{\sum U_{V_{Ri}}^2}{N}} \quad (13)$$

Los grados de libertad de este componente son:

$$v_i = \frac{U_{VRef}^4}{\sum \frac{U_{V_{Ri}}^4}{N_{Ri} - 1}} \quad (14)$$

donde:

N_{Ri} = número de participantes de cada ejercicio y n = número de ejercicios de intercomparación empleados en el cálculo.

$-U_{media}$ Se obtiene a partir de la S de reproducibilidad (S_d), la desviación estándar asociada a la diferencia entre los valores obtenidos por el laboratorio y los considerados reales por el organizador del circuito intercomparativo, tal que:

$$U_{media} = \frac{S_d}{\sqrt{n_d}} \quad (15)$$

donde:

n_d = número de valores duplicados obtenidos durante la validación.

Los grados de libertad de esta componente serán n_d-1 .

$-U_{repro}$ se obtiene a partir del coeficiente de variación aplicado al valor que nos interese (si se realiza por rangos) o al valor medio de los intercomparativos a partir de la reproducibilidad de las exactitudes

$$U_{repro} = \frac{CV \cdot V_{actual}}{\sqrt{N_{actual}}} = \frac{R \cdot \bar{V}_{laboratorio\ medio}}{1} \quad (16)$$

donde:

N_{actual} = número de repeticiones realizadas cada día.

Los grados de libertad de esta componente son los $n-1$ pares de datos empleados para el cálculo del CV del método.

$-U_{CORR}$ sólo es aplicable si el test t demuestra la existencia de diferencias significativas. Entonces:

$$U_{CORR} = \frac{E \cdot V_{actual}}{\sqrt{3}} \quad (17)$$

Para el cálculo de K será necesario tener en cuenta los grados de libertad efectivos:

$$v_{ef} = \frac{U_C^4}{\frac{U_{VRef}^4}{v_{VRef}} + \frac{U_{media}^4}{v_{media}} + \frac{U_{repro}^4}{v_{repro}} + \frac{U_{CORR}^4}{v_{CORR}} \text{ (Si aplica al } t_{cal} > t_{tab})} \quad (18)$$

De esta manera la incertidumbre expandida será:

$$U_T = U_C \cdot K \quad (19)$$

3.- Resultados y Discusión

3.1 Validación mediante vinos certificados como MRE

Los resultados primarios obtenidos de las 10 repeticiones realizadas en condiciones diversas y con ambos reactivos indistintamente se resumen a continuación:

Tabla 3. Datos primarios obtenidos en validación con MRE

Referencia	Vcert. (g/l)	Ucert (k=2; 95%)	Mediaobt. (g/l)	$\sigma_{obt.}$	Rep.(n)
MR-1	0,24	0,01	0,22	0,01	10
MR-2	0,46	0,01	0,43	0,01	10
MR-3	0,67	0,01	0,63	0,02	10
MR-4	1,00	0,05	1,04	0,01	10

Referencia	Vcert. (g/l)	Ucert (k=2; 95%)	Mediaobt t. (g/l)	$\sigma_{obt.}$	Rep.(n)
Muestra1	--	--	0,20	0,003	10
Muestra2	--	--	0,43	0,01	10
Muestra3	--	--	0,58	0,006	10
Muestra4	--	--	1,07	0,02	10
Blanco	--	--	0,006	0,005	10

El cálculo del Índice de Compatibilidad efectuado con los datos expuestos confirma que los resultados son comparables ($IC < 1$ en todos los casos), por lo que no es necesario realizar ninguna corrección y U_{CORR} se considera despreciable.

En virtud de las medias y desviaciones expuestas anteriormente fueron calculadas las incertidumbres de la tabla siguiente conforme a las ecuaciones descritas en el apartado 2.1.

Tabla 4. Incertidumbres obtenidas mediante vinos certificados MRE

Rango	U_P	U_{VM}	U_M	U_{CORR}	U	I (g/l)
1 ^{er} cuartil	0,005	0,007	0,003	$<10^{-3}$	0,009	0,019
2 ^o cuartil	0,005	0,010	0,011	$<10^{-3}$	0,016	0,033
3 ^{er} cuartil	0,005	0,024	0,006	$<10^{-3}$	0,025	0,057
4 ^o cuartil	0,025	0,009	0,024	$<10^{-3}$	0,036	0,073

Para el caso particular de las determinaciones enzimáticas se puede definir el límite de detección como la media de los blancos más tres veces la desviación estándar, y el límite de cuantificación de manera similar pero con 10 veces la desviación estándar obtenida, obteniéndose así 0,021 y 0,058 para cada uno de los límites respectivamente.

3.2 Validación mediante resultados de intercomparativos

Los datos primarios enviados y recibidos en los informes de intercomparación figuran en la tabla siguiente:

Tabla 5. Validación por pares de valores de interlaboratorios

V_R	S_{VR}	n_R	V_{lab}	d_i	E_i (%)	U_{VRI}
0,43	0,04	44	0,47	-0,04	-9,30	0,0060
0,50	0,05	58	0,49	0,01	2,00	0,0066
0,42	0,05	55	0,38	0,04	9,52	0,0067
0,31	0,05	63	0,35	-0,04	-12,9	0,0063
0,62	0,06	56	0,61	0,01	1,61	0,0080
0,24	0,04	51	0,21	0,03	12,5	0,0056
0,37	0,04	52	0,36	0,01	2,7	0,0055
0,26	0,04	41	0,25	0,01	3,84	0,0062
0,26	0,04	49	0,26	0,00	0,00	0,0057
0,50	0,04	48	0,49	0,01	2,00	0,0058

Al aplicar el test t con dichos valores se obtiene que $t_{calculada}$ (0.49) es menor que $t_{tabulada}$ (2.26), por lo que no existirían diferencias significativas que conllevaran el cálculo adicional de U_{CORR} .

La contribución de cada una de las incertidumbres aplicables conforme al razonamiento aplicado en el epígrafe 2.2 con los datos primarios anteriores se describe a continuación:

Tabla 6. Incertidumbres mediante resultados de intercomparativos

U_{VRef}	U_{Media}	U_{Repro}	U_{Corr}	U	K	I (mg/l)
0,006	0,007	0,029	<0,001	0,031	2,2	0,069

4.- Conclusiones

En primer lugar el método enzimático utilizado a título de ejemplo resulta apto y validado para su uso en el laboratorio, al ser todos los resultados obtenidos comparables con los de referencia, ya sean provenientes de materiales de referencia o ejercicios interlaboratorios. Además, los resultados obtenidos para la incertidumbre por ambas vías son muy similares, quedando demostrada la fortaleza de los métodos enzimáticos secuenciales para su uso continuado en matrices de alimentos.

Habitualmente la incertidumbre obtenida por el método de validación con pares de valores procedentes de ensayos interlaboratorios suele ser mayor que la obtenida mediante el uso de materiales de referencia o patrones. Esto se debe fundamentalmente a que la dispersión asociada al resultado es mayor en el caso de intercomparativos que se basan en datos procedentes de un gran número de participantes con incertidumbres diferentes. No obstante, en nuestro caso el mayor valor de incertidumbre obtenido resultó ser el relativo al cuartil superior de la validación mediante materiales de referencia ($0,073 > 0,069$), debido probablemente al mayor valor absoluto de dicho cuartil (1 g/l) frente a la media de los valores procedentes de intercomparativos (0,39 g/l).

El presente estudio demuestra que la cuantificación de ácido acético en muestras de vino es un método adecuado para el control de este analito en laboratorios de rutina. El método puede aplicarse con los diversos reactivos enzimáticos disponibles en el mercado para diversas matrices obteniéndose incertidumbres bajas.

La poca preparación de muestra que conlleva esta técnica posibilita el análisis secuencial de varias alícuotas en poco tiempo, lo que permite contar con un método práctico para su aplicación en aquellos laboratorios que realicen un número importante de determinaciones con alta fiabilidad.

Referencias

- International organization of wine and wine (OIV), *Compendium of International methods of wine and must analysis* Vol 1&2, 2014.
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, *Wine analysis and production*. Van Nonstrand Reinhold; 1 edition (December 31, 1990).
- Bermeyer, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed. Vol.1, pp 112-117. Academic Press, Inc., New York.



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser utilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACION Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Distribución y venta:

Paseo de la Infanta Isabel, 1
28014 Madrid
Teléfono: 91 347 55 41
Fax: 91 347 57 22

Impresión y encuadernación:

Taller del Centro de Publicaciones del MAGRAMA

NIPO: 280-14-186-4 (Papel)
Depósito Legal: M-30525-2014
NIPO: 280-14-185-9 (línea)
NIPO: 280-14-187-X (CD)
Depósito Legal: M-30524-2014

Tienda virtual: www.magrama.es
centropublicaciones@magrama.es

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

Datos técnicos: Formato: 21x29,7 cm. Caja de texto: 15x23,3 cm. Composición: Una columna. Tipografía: Times New Roman a cuerpo 10. Encuadernación: Fresado. Papel: Igloo de 90 gramos. Cubierta cartulina gráfica mate de 250 gramos. Tintas: 4.

En esta publicación se ha utilizado papel libre de cloro de acuerdo con los criterios medioambientales de la contratación pública.