

**Métodos de ensayo utilizados en la determinación de amino nitrógeno libre (NFA) en
materiales que cursan o están destinados a procesos de fermentación alcohólica**

Jenny Constanza León Niño

Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD

Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería-ESBC

Programa de Química

Bogotá, octubre de 2021

Métodos de ensayo utilizados en la determinación de amino nitrógeno libre (NFA) en materiales que cursan o están destinados a procesos de fermentación alcohólica

Trabajo de grado presentada como requisito para optar al título de:

Químico

Jenny Constanza Leon Niño

Asesora:

Marcela Andrea Zambrano

Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD

Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería - ESBC

Programa de Química

Bogotá, octubre de 2021

A mi creador por su amor infinito.

A quienes contribuyeron de diversa manera en la culminación de este proyecto

Jenny C. León

Agradecimientos

Deseo presentar mis agradecimientos a:

Mi asesora Marcela Zambrano por su orientación, apoyo para el desarrollo de esta monografía.

Resumen

La determinación de Amino Nitrógeno Libre, también conocido como Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) el cual suele expresarse también bajo los acrónimos FAN o YAN por sus siglas en inglés (Yeast Assimilable Nitrogen), es necesaria en los procesos fermentativos; para dicha determinación hay diversos métodos de análisis, los cuales presentan similitudes o diferencias de acuerdo a las características de cada método y de la técnica analítica empleada. Independientemente del método aplicado para la determinación, es primordial que este cuantifique los analitos de interés, ya que, la levadura, microorganismo encargado de la fermentación absorbe únicamente el nitrógeno proveniente de los alfa-aminoácidos (a excepción de la prolina) y el ion amonio.

Se conocen algunos métodos de análisis para dicha determinación, como por ejemplo el método de ninhidrina, el de formaldehído y el método OPA (o-ftaldialdehído) entre otros; los cuales varían según la técnica utilizada, el desarrollo procedimental, rangos de aplicación, entre otros aspectos como uso de equipos, reactivos o el tratamiento de la muestra. Resulta necesario revisar a fondo si los métodos aplicados cuantifican efectivamente las fuentes de nitrógeno en los analitos de interés (α -aminoácidos – prolina + ion amonio); conviene considerar los aspectos como aplicabilidad, confiabilidad, tiempos de respuesta, entre otras características propias de cada método.

La revisión permite describir y analizar cada uno de los métodos seleccionados, así recopilar información mediante la comparación de las características consideradas relevantes, con el fin de brindar información clara y unificada.

Para la revisión bibliográfica se genera una lista de búsqueda a partir de expresiones y términos relativos a cada método en estudio, usándolos en motores de búsqueda, bibliotecas científicas, bases de datos, repositorios institucionales e incluso sitios web; la elección de los documentos se realiza de acuerdo a: el tipo, la información contenida, su alcance y la relevancia, año de elaboración y su conexión con otros documentos.

Palabras Clave: Levadura, nitrógeno asimilable, fermentación, método de análisis.

Abstract

The determination of Free Amino Nitrogen, also known as Easily Assimilable Nitrogen (NFA) which is usually also expressed under the acronyms FAN or YAN or its acronym in English (Yeast Assimilable Nitrogen), is necessary in fermentation processes; for this determination there are several methods of analysis which present similarities or differences according to the characteristics of each method and the analytical technique used. Regardless, the method applied for the determination is essential for quantifies the analyte of interest, because yeast microorganism who develops the fermentation absorbs only Nitrogen from alpha-amino acids (except the proline) and the ammonium ion.

Some analytical methods are known, such as, the ninhydrin method, the formaldehyde method and the OPA (o-phthaldialdehyde) method, among others; which vary according to the technique used, the procedural development, application ranges, and other aspects as the use of equipment, reagents or the treatment of the sample. It is necessary review if the applied methods effectively quantify the nitrogen sources in analytes of interest (α -amino acids - proline + ammonium ion); it is convenient to consider aspects such as applicability, reliability, response times, among other characteristics of each method.

This review describes and analyzes each one of the selected methods to collect information about analysis methods through a comparison of the relevant characteristics, in order to provide clear and unified information.

In order to the bibliographic review, a search list is generated as of expressions and terms related to each study method, these terms are used in search engines, scientific libraries, databases, institutional repositories and even websites, the documents are chosen according to: type, the information contained, the scope and the relevance, year of writing and connection with other documents.

Keywords: Yeast, assimilable nitrogen, fermentation, analysis method.

Introducción

La fermentación alcohólica está relacionada con la producción de bebidas alcohólicas o directamente con la producción de etanol; estos procesos productivos se desarrollan gracias a un microorganismo que se encarga de transformar azúcares en etanol y dióxido de carbono; se trata de la levadura; este microorganismo no solo consume azúcares dentro de sus procesos metabólicos, también requiere de otros compuestos necesarios para un adecuado desarrollo. El nitrógeno es después de los azúcares, el nutriente más relevante en el metabolismo de la levadura; por ello dentro de los controles que se llevan a cabo dentro de la fermentación se halla la determinación del nitrógeno asimilable por la levadura. Comúnmente se indica como NFA, FAN o YAN a los componentes de nitrógeno presentes en el sustrato o medio donde la levadura se encuentra y que pueden ser absorbidos o asimilados por el microorganismo; esto se debe a que no todas las fuentes de nitrógeno que estén presentes en el sustrato, pueden ser metabolizadas por la levadura, ya que ésta solo puede aprovechar el nitrógeno que se halla bajo la forma ion amonio NH_4^+ o aminoácidos primarios con la excepción de la prolina; por ello, una concentración alta de nitrógeno total en el sustrato no quiere decir que todo puede ser consumido por la levadura; de ahí, la importancia de contar con un método de análisis que pueda usarse para determinar únicamente la fracción de nitrógeno asimilable (en adelante será referido como NFA).

La determinación del NFA en un proceso fermentativo que se hace para establecer la cantidad de nitrógeno disponible para la levadura; en el caso de que exista una deficiencia, se requiere ajustar apropiadamente su concentración, mediante una adición exógena de componentes que aporten nitrógeno asimilable para la levadura.

Existen diferentes métodos de análisis que son indicados para la determinación de NFA, la información de estos se engloba mediante una revisión documental de la literatura existente, la cual en general estará asociado al desempeño de la levadura y sus necesidades de nitrógeno en la fermentación alcohólica. La información referente a cada método seleccionado presenta sus respectivas características relacionadas al principio del método, las técnicas analíticas aplicadas, el analito o analitos que cuantifica, recursos necesarios, aspectos relacionados a seguridad que conviene conocer; estos aspectos son considerados en la primer etapa de este documento, posterior a ello se construye una matriz de comparación que busca brindar datos específicos de características relacionadas a la calidad del método y que pone en evidencia las características a favor de cada uno. La construcción de la matriz permite sintetizar la información dentro de un mismo documento; presentando datos sobre cada método estudiado, permitiendo exponer en conjunto la información comparativa y relevante. A partir de todos los datos obtenidos, especialmente en la etapa descriptiva se construyen los diagramas de cada método de análisis donde se indica cómo se desarrolla cada uno.

Contenido

Planteamiento del Problema.....	18
Descripción de los Métodos de Análisis Seleccionados.....	35
Calidad en Métodos Analíticos y Matriz Comparativa.....	98
Metodología de Ejecución Analítica.....	113
Aplicabilidad de los Métodos de Acuerdo a las Características de Desempeño.....	124
Conclusiones y Recomendaciones.....	136
Referencias.....	139

Lista de Figuras

Ilustración 1. Glucólisis y fermentación.	27
Ilustración 2. Reacción química formaldehído y aminoacido	39
Ilustración 3 Secuencia de formación del color.....	48
Ilustración 4: Reacción de OPA en determinación de alfa amino nitrógeno	56
Ilustración 5. Mecanismo de reacción OPA-Tiol (Mercaptoetanol),.....	58
Ilustración 6. Mecanismo ion amonio catalizado por GLDH.	62
Ilustración 7. Esquema de un sistema cromatográfico HPLC.	72
Ilustración 8. Reacción de derivatización OPA/NAC empleada en análisis de aminoácidos	77
Ilustración 9. Cromatograma obtenido a partir de muestra de vino y vino enriquecido.....	78
Ilustración 10. Representación esquemática de un interferómetro.	86
Ilustración 11. Regiones aproximadas de absorción de tipos comunes de enlaces.....	88
Ilustración 12. Diagrama de flujo método de formaldehído.	115
Ilustración 13. Diagrama de flujo método de ninhidrina	117
Ilustración 14. Diagrama método OPA-Enzimático.	119
Ilustración 15. Diagrama método HPLC	121
Ilustración 16. Diagrama Método FTIR.....	123
Ilustración 17. Estructura genérica de un aminoácido	126

Lista de Tablas

Tabla 1. Compuestos Nitrogenados en un Mosto de Uvas. Fuente: Fabrice Lorenzini Et Ágnes Dienes-Nagy (2016).....	29
Tabla 2. Aproximación costos de equipos.....	96
Tabla 3A Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	104
Tabla 3B Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	105
Tabla 3C Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	106
Tabla 3D Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	107
Tabla 3E Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	108
Tabla 3F Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	109
Tabla 3G Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio.....	110
Tabla 4. Variaciones en el Empleo de Acrónimos.....	127

Lista de Ecuaciones

Ecuación 1. Reacción química formaldehído + fuente de nitrógeno inorgánico	40
Ecuación 2. Cálculo de concentración de NFA, método formaldehído.....	40
Ecuación 3. Ley de Lambert-Beer	44
Ecuación 4. Concentración según valores de absorbancia medidos	45
Ecuación 5. Cálculo de Amino nitrógeno libre, método Ninhidrina. Fuente, EBC Analytica (2015); Geisler y Weiß (2015).....	50
Ecuación 6. Concentración amino nitrógeno- OPA, Fuente: Megazyme (2012)	60
Ecuación 7. Reacción ion Amonio +Enzima GLDH.....	61
Ecuación 8. Cálculo concentración amoniaco método Enzimático	64
Ecuación 9. Coeficiente de Variación %.	101

Lista de Abreviaturas

AOAC: Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) International

AQC: Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo

ASBC: American Society of Brewing Chemist

ATR: Reflectancia Total Atenuada

CG-GC: Cromatografía de Gases

CL-LC: Cromatografía de Gases

DAD: Detector de Arreglo de Diodos

DAP: Fosfato diamónico

DEEMM: Etoximetilenmalonato de dietilo

EBC: European Brewery Convention

FAN: Free alpha-amino nitrogen

FAR-IR: Far Infrared Range

FT: Transformada de Fourier

FT-IR o FTIR: Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier

GABA: Ácido γ -amino butírico

GLDH: Glutamato deshidrogenasa

HPLC: High Performance Liquid chromatography

IR: Infrarrojo

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MCE: 2-mercaptoetanol

MeOH: Metanol

MIR: Infrarrojo Medio

MPA: 3-mercaptopropionico

MSDS: Hojas de datos de seguridad

NAC: N-acetilcisteína

NAD⁺: Ion de Nicotin Adenin Dinucleótido

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NFA: Nitrógeno Fácilmente Asimilable

NIR: Near Infrared

NOPA: Alfa-amino nitrógeno por o-ftaldialdehído

OPA: o-Ftaldialdehído

OPD: Retardo óptico

PAN: Amino nitrógeno primario

PCR: Regresión de componentes principales

PLS: Regresión de mínimos cuadrados parciales

PVC: Polivinilcloruro

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

R²VAL: Coeficiente de determinación para validación

R²CAL: Coeficiente de determinación para calibración

RMSEC: Error cuadrático medio de calibración

RMSEP: Error cuadrático medio de predicción

RP: Fase reversa

RPD: Desviación predictiva residual

RPDVAL: Desviación predictiva residual en validación

RSD: Desviación estándar relativa

TDI: Tecnología de Difusión Ibérica

UV: Ultravioleta

UV-VIS: Ultravioleta-visible

VIS: Visible

YAN: Yeast assimilable nitrogen

Planteamiento del Problema

En este capítulo se describen las razones que llevaron a establecer una búsqueda de métodos de ensayo utilizados en la determinación de Amino Nitrógeno Libre (NFA) en materiales que cursan o están destinados a procesos de fermentación alcohólica, mostrando específicamente los propósitos que se desean alcanzar en cada sección del documento, lo cual se sustenta en la relevancia que tiene la determinación del nitrógeno asimilable por la levadura en los diferentes materiales que están destinados a procesos fermentativos y que finalmente pueden afectar o beneficiar el proceso dentro del cual se desarrollan.

Contenido

Definición del Problema

Justificación

Objetivos

Objetivo general

Objetivos específicos

Determinación del nitrógeno asimilable por la levadura.

Importancia de la determinación de NFA en la industria del etanol carburante.

Definición del Problema

En la industria licorera, cervecera, vinícola y del etanol en general, el microorganismo utilizado para realizar procesos fermentativos es la levadura, transformando los azúcares presentes en el sustrato, en alcohol etílico y dióxido de carbono. La levadura requiere nutrientes, como el nitrógeno, que son determinantes para un desarrollo óptimo de la fermentación. Los compuestos nitrogenados son los nutrientes mayormente asimilados por la levadura después de los compuestos de carbono (Roca-Mesa, Sendra, Mas, Beltran y Torija, 2020). Además, solo algunos de los compuestos nitrogenados pueden ser asimilados o metabolizados por la levadura; estos incluyen alfa-aminoácidos individuales (a excepción de prolina), amoníaco y péptidos pequeños (Hill y Stewart, 2019), a estos compuestos se les suele llamar Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA).

El NFA, es esencial para el crecimiento de las levaduras, este se usa en la síntesis de las proteínas, en los componentes de la pared celular y las enzimas; un NFA escaso o en exceso puede producir inconvenientes como fermentaciones paradas o lentas y generar sulfuro de hidrógeno (H_2S) como producto intermedio de la síntesis de aminoácidos azufrados, ya que, al no existir suficiente nitrógeno se genera una carencia de los precursores de dicha síntesis provocando acumulación de H_2S en los medios de fermentación (Abbiotek, 2017; Hidalgo, 2018). La concentración de este nutriente influye tanto en la cinética de la fermentación como en la calidad del producto final (Lallemand, 2015); es por ello la importancia de su determinación.

Los métodos de análisis que existen para la determinación y cuantificación de NFA son químicos e instrumentales; los cuales varían en función de las técnicas aplicadas como volumetría, potenciometría, espectrofotometría y cromatografía. Los más empleados comúnmente son el método de formaldehído, los métodos combinados enzimático y OPA (o-ftaldialdehído) (Petrovic, Aleixandre-Tudo, y Buica, 2019), el método de ninhidrina, el de aminoácidos primarios por HPLC y el método de FT-IR (Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier), estos últimos frecuentemente empleados a nivel investigativo.

Debido a que la determinación de NFA normalmente se desarrolla sobre un proceso intermedio, no se tiene una norma de obligatorio cumplimiento para la cuantificación; algunas organizaciones como asociaciones de cerveceros o de la industria vinícola recomiendan el método a emplear para realizar el control en sus procesos, por ejemplo el método de Ninhidrina para análisis de mostos y cervezas es indicado por EBC (European Brewery Convention) (EBC Analytica, 2015). En la industria vinícola, tanto en libros como documentos de investigación, mencionan diferentes métodos para determinar NFA como: método de formaldehído (Hidalgo, 2018) método OPA y Enzimático, método formaldehído e incluso HPLC (Gump, Zoecklein, Fugelsang y Whiton; 2002); por su parte en la industria de producción de etanol carburante, el análisis se desarrolla según el método recomendado por quienes diseñan la planta de producción o el proceso, es el caso de P. Industries, una empresa que suministra plantas para la producción de etanol, en su manual de métodos de análisis, describe el uso del método de Formaldehído para determinación de NFA (P. Industries, 2004). También, se encuentran fabricantes de reactivos que ofrecen kits y *software* para el empleo de determinado método. En general, la selección del

método es flexible y depende de la decisión del interesado; incluso sí en la misma matriz se utilizan métodos diferentes.

Esta flexibilidad en la selección del método puede llevar a que, por desconocimiento u omisión de criterios de calidad, no se consideren todas las características relevantes del método a utilizar o no se tengan definidos los requisitos analíticos, que son determinantes en la calidad de los resultados. Antes de ser usado un método debe asegurarse que se pueda lograr el desempeño requerido (Organización Internacional de Normalización ISO/IEC 17025, 2017). Adicional a ello, algunas descripciones de métodos suelen ser poco profundas u omitir datos que resultan necesarios para la correcta selección del método que pueda brindar resultados confiables.

Considerando lo anterior, la pregunta de investigación que se busca responder mediante la presente monografía es la siguiente: ¿Qué métodos de análisis cuantifican con mayor efectividad los analitos de interés para la nutrición de la levadura y que parámetros estadísticos permiten determinar el desempeño de cada método identificado?

Justificación

La determinación de NFA a nivel industrial, se desarrolla como forma de control de los procesos fermentativos para tomar decisiones que pueden afectar procesos subsiguientes, así como el rendimiento del proceso o calidad del producto final; de allí, la necesidad de conocer la aplicación de métodos analíticos idóneos que generen resultados confiables sobre la disponibilidad de NFA.

Existen varios métodos de análisis para cuantificar NFA, cada uno presenta similitudes o diferencias en aspectos netamente metodológicos o en los relacionados a su desempeño e idoneidad. Algunos métodos cuentan con mayor disponibilidad de materiales, reactivos y equipos para su ejecución, frente a otros que requieren equipos más avanzados, capacitación del personal para su operación, entre otros aspectos que no están al alcance de todos los laboratorios o industrias interesadas en su aplicación.

A nivel comercial, se ofrecen paquetes de análisis indicados para la cuantificación de NFA, basados en métodos de referencia, lo cual lleva a que algunos métodos sean más conocidos que otros; sucede igualmente con lo relacionado a la información suministrada sobre el método de análisis, su principio, las posibles interferencias, las características relacionadas a la calidad; pueden no ser totalmente descritas e insuficientes para la descripción de cada método. Por tal razón, en el presente trabajo de tesis se investigó sobre los métodos recomendados y aquellos con mayor disponibilidad a fin de desarrollar un análisis de cada uno.

Los métodos seleccionados son:

- El método de titulación con Formaldehído “probablemente el más conocido y utilizado en las bodegas (...) también llamado método Sørensen” (Muñoz y Tobeña, 2013, p. 39).
- El método OPA que utiliza o-ftaldialdehído y es capaz de detectar nitrógeno libre de α -aminoácidos (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007), este se desarrolla en conjunto con el método enzimático, el cual se utiliza para medir el amonio utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa (Muñoz y Tobeña, 2013).
- El método de ninhidrina recomendado por la European Brewery Convention (EBC)
- El método HPLC para determinación de aminoácidos, “el cual combina velocidad y sensibilidad en la cuantificación de aminoácidos individuales” (Gump et al., 2002).
- El método FT-IR “espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es un método alternativo para la medición de nitrógeno asimilable” Dubernet, Traineau, Lerch, Dubernet y Coulomb (Citado por Casalta, Sablayrolles y Salmon, 2013, p. 272).

Partiendo del análisis de cada metodología analítica y las técnicas empleadas, se propone desarrollar una comparación a partir de la revisión de información confiable generada desde la búsqueda en bases de datos, revistas de publicación académica, páginas web, repositorios institucionales entre otros recursos de tipo investigativo, con el fin de obtener información sobre las características que engloba todo el desarrollo de cada método de análisis y así, generar una guía con información útil, confiable y unificada, a disposición de otros profesionales en el ámbito de procesos productivos o de índole académico. A su vez, será un aporte de información

útil a la industria nacional, donde actualmente se desarrollan procesos industriales en producción de etanol, el cual lleva consigo procesos fermentativos previos que requieren implementar un método analítico apropiado para la determinación de NFA.

Objetivos

Objetivo General

Comparar métodos analíticos empleados en la determinación de Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) en materiales que experimentan fermentación alcohólica, mediante revisión y análisis de la literatura existente para extraer y compilar las características de cada uno de los métodos seleccionados que permita establecer su aplicabilidad.

Objetivos Específicos

- Describir la técnica analítica y el principio de funcionamiento de cada método para establecer como se genera el mecanismo de respuesta.
- Construir una matriz de comparación con características cualitativas y cuantitativas de los métodos de análisis seleccionados.
- Elaborar el diagrama de flujo con la secuencia de pasos para la ejecución de cada método analítico en la determinación de NFA.
- Relacionar las características de los métodos analíticos con su desempeño y aplicación, para establecer la eficiencia en la cuantificación de analitos de interés.

Determinación del Nitrógeno Asimilable por la Levadura

La levadura es el microorganismo encargado de convertir azúcares, principalmente fructosa y glucosa, en alcohol y dióxido de carbono en la fermentación; este es un proceso complejo que engloba transformaciones químicas, bioquímicas y fisicoquímicas (Correia, 2011).

Como se observa en la Ilustración 1, la fermentación comienza con la glucólisis, donde, en ausencia de oxígeno, la molécula de glucosa se transforma a glucosa-6-fosfato consumiendo ATP, luego se transforma en fructosa-6-fosfato por acción de la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa, prosiguen otras reacciones catalizadas por otras enzimas, con consumo y producción de moléculas de ATP hasta la formación del piruvato, el piruvato es transformado por descarboxilación (con acción del piruvato descarboxilasa) produciendo 2 moléculas de acetaldehído y liberando moléculas de CO₂, a su vez el acetaldehído es transformado por acción de la alcohol deshidrogenasa formándose finalmente el etanol.

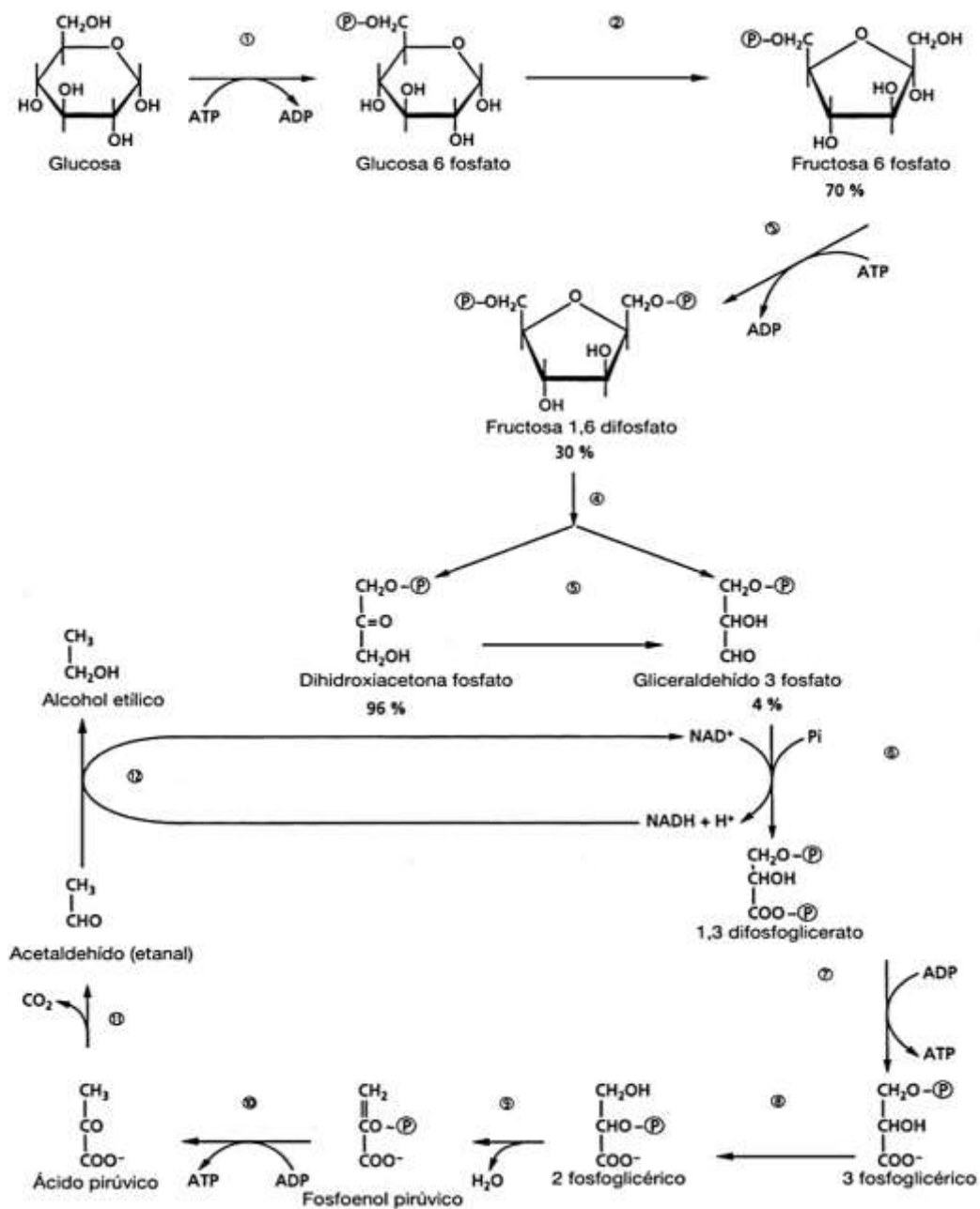
La fermentación es utilizada para la producción de etanol, cerveza, vinos y otras bebidas alcohólicas, donde se requieren azúcares fermentables como la glucosa y fructosa junto a otros compuestos necesarios para el desarrollo de la levadura y que permiten conferir algunas características al producto final.

Las levaduras tienen requerimientos nutricionales relativamente simples, una fuente de carbono reducida, puede ser un compuesto tan complicado como un disacárido (como la sacarosa formada por la unión de glucosa y fructosa) o tan simple como el acetato; necesita fuentes de nitrógeno orgánico en forma asimilable y una variedad de sales y oligoelementos para fines

metabólicos; de todos los nutrientes que asimila la levadura el nitrógeno es superado solo por las fuentes de carbono (Buglass, 2011).

Ilustración 1

Glucólisis y fermentación.



Nota. Adaptado de *Tratado de Enología* (p. 603), por J. Hidalgo, 2018, Mundi-Prensa

El nitrógeno asimilable, factor determinante en la fermentación alcohólica, presenta una disposición natural variable en el sustrato o medio de fermentación, proveniente de la materia prima utilizada en la fermentación, sean uvas, manzanas, cebada, jugo de caña, etc. La proporción del nitrógeno en dichas materias primas varía de acuerdo con el cultivo, el suelo, las variedades, el clima, etc. (Tabla 1). La levadura utiliza preferiblemente fuentes simples de nitrógeno, la forma asimilable consiste en una fracción mineral o inorgánica y una fracción orgánica:

- **Iones amonio (NH_4^+):** fuente inorgánica, se trata de una de las fuentes preferidas por la levadura ya que se asimila fácilmente (Bell y Henschke, 2005).
- **Los α -aminoácidos** (aminoácidos primarios): fuente orgánica, pueden definirse como ácidos orgánicos con un grupo amino en posición alfa. Con excepción de la prolina o hidroxiprolina, dado que, aun siendo aminoácidos no son asimilables por la levadura, su grupo amino no es primario y se considera que está N-sustituido por la cadena lateral R. Bajo ciertas condiciones del medio la levadura puede utilizar también algunos péptidos pequeños; aquellos de mayor peso molecular que de igual forma se hallan en el sustrato no son asimilables.

Tabla 1.*Compuestos nitrogenados en un mosto de uvas.*

Datos de literatura	
Nitrógeno Total	0,2 a 1,7 g/L
<i>Nitrógeno Mineral</i>	
Amonio NH ₄ ⁺	5 a 10 % del Nitrógeno total
<i>Nitrógeno Orgánico</i>	
Proteínas	2 a 5 % del Nitrógeno total
Polipéptidos	10 a 30 % del Nitrógeno total
Aminoácidos	60 a 80 % del Nitrógeno total
<i>Nota.</i> Fabrice Lorenzini Et Ágnes Dienes-Nagy (2016, p. 330)	

El nitrógeno influye en el desempeño de la levadura durante el proceso de fermentación; la levadura usa el nitrógeno presente en el medio fermentativo en la biosíntesis de proteínas, aminoácidos, nucleótidos y otros metabolitos, incluidos compuestos volátiles (Gobert, Tourdot-Maréchal, Sparrow, Morge, y Alexandre, 2019). El nitrógeno actúa entonces sobre la producción de proteínas estructurales implicadas en la formación de biomasa, la cinética del transporte de los azúcares y el consecuente aumento de la velocidad de fermentación; pero las funciones del nitrógeno dentro de la célula no terminan allí, ya que su metabolismo, genera la formación de compuestos aromáticos que para el caso de los vinos es importante en la formación de la matriz aromática, por lo cual, el contenido de nitrógeno puede modular el perfil aromático de un vino (Lallemand, 2015); de igual forma en otras industrias como la cervecera, atribuyen al nitrógeno el crecimiento saludable, la viabilidad, vitalidad y eficiencia de la fermentación así como la estabilidad y calidad de la cerveza (Stewart, Hill, y Lekkas, 2013).

Las levaduras, consumen el nitrógeno presente mediante transporte activo y permeasas específicas, para lo cual la membrana plasmática debe poseer transportadores proteicos membrenarios o permeasas que llegan a ser específicos para el tipo de nitrógeno que se espera introducir en la célula; luego de ello, el nitrógeno entra a la vía central de metabolismo del nitrógeno en forma de amonio. El consumo de nitrógeno se da en función de la capacidad de asimilación en el metabolismo central de nitrógeno, que en la levadura está regulado por el sistema de represión catabólica¹; visto de esta forma, el proceso de consumo de este nutriente y su regulación por parte de la levadura resulta un tanto complejo (Jara et al., 2014; Hidalgo, 2018).

En el sustrato se pueden encontrar varias fuentes de nitrógeno, este elemento puede hallarse bajo diferente forma como proteínas, aminoácidos, ion amonio, amidas, péptidos y polipéptidos, existen también otras formas que se hallan en bajas concentraciones como las vitaminas, nucleótidos y nitratos; sin embargo, la levadura no asimila o metaboliza todas las formas de nitrógeno. La levadura utiliza el nitrógeno presente que se encuentre bajo la forma de alfa-aminoácidos, el amonio y parcialmente algunos péptidos; la prolina a pesar de ser un aminoácido es el único aminoácido que la levadura no puede asimilar (Lallemand, 2015; González, 2000). Respecto a los péptidos, algunos autores no los mencionan dentro del grupo del conjunto de asimilables, dado que su absorción se da en determinadas condiciones del medio donde influyen aspectos como el contenido de azúcares, la presencia o ausencia de oxígeno, la cepa de levadura y las preferencias nutricionales de esta. Los péptidos pequeños de bajo peso molecular, que en determinadas condiciones pueden usarse como fuentes nutricionales de

¹ Selección de las fuentes de nitrógeno que permiten un mejor crecimiento.

aminoácidos, fuentes de carbono o nitrógeno y precursores de péptidos de la pared celular durante el crecimiento de la levadura; las cepas de levadura transportan péptidos con no más de tres residuos de aminoácidos, aunque esto puede variar según la cepa, además de que su absorción se da en orden específico de acuerdo a los aminoácidos que los componen (Stewart, 2013; Bell y Henschke, 2005). Por lo anterior, el nitrógeno asimilable o metabolizable por la levadura se refiere principalmente a dos tipos de compuestos, el nitrógeno α -amino y los iones de amonio, ya que estas fuentes si pueden atravesar fácilmente la membrana celular de la levadura (Petrovic et al., 2019); otras posibles fuentes de nitrógeno que puedan existir en el sustrato o medio, no pueden ser asimiladas por la levadura al no presentar una gran actividad proteolítica extracelular.

Para definir las fuentes de nitrógeno que son asimilables por la levadura, se encuentran varios términos:

- Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA).
- Nitrógeno asimilable por la levadura (YAN) término proveniente de *Yeast assimilable nitrogen*.
- Amino nitrógeno libre (FAN) por sus siglas en inglés *Free α -Amino Nitrogen*.

De cierto modo, el acrónimo a usar depende en parte del tipo de industria en el que se esté mencionando, ya que, para la cervecería resulta más común ver el término FAN, de hecho el término es muy usado por la ASBC (*American Society of Brewing Chemist*) y la EBC (*European Brewery Convention*), mientras que en temas de vinos o sidras es muy usado YAN o incluso NFA; hay quienes usan cualquiera de los acrónimos, sólo para referirse a la fracción de

compuestos que la levadura consume, indiferentemente del tipo de industria en la que sea mencionado.

El contenido de NFA en el sustrato es variable; en el caso de deficiencias, las consecuencias sobre el proceso pueden ir desde fermentaciones lentas y languidecientes por baja población de levadura, afectación de la actividad celular, riesgo a que la fermentación sea detenida por la disminución de actividad de transporte de azúcares al detenerse la síntesis de proteínas que da como resultado una utilización incompleta del azúcar, puede incrementar la producción de CO₂ que a su vez demanda un mayor gasto energético para mantenimiento de la temperatura durante el proceso, e incluso se puede afectar la calidad del producto final por la producción de compuestos indeseados como sulfuro de hidrógeno, tioles y alcoholes superiores y falta de formación de compuestos positivos como algunos ésteres etílicos (butanoato de etilo, hexanoato de etilo, los cuales aportan aromas frutales) y ácidos grasos volátiles como por ejemplo el ácido acético o el diacetilo, los cuales en el caso de los vinos están asociados en forma positiva porque contribuyen al sabor, vinos elaborados con deficiencias de NFA pueden tener un nivel sensorial más bajo (Boudreau, Peck, O'Keefe y Stewart, 2017; Buglass, 2011; Bely, Sablayrolles y Barre, 1990). También, puede suceder que los contenidos de nitrógeno sean elevados, en este caso, aunque hay efectos positivos como un incremento de la velocidad de fermentación, también se pueden presentar algunos inconvenientes que pueden ser producción de acidez volátil, inestabilidad microbiana o formación de neblinas de proteínas (Buglass, 2011). Por lo anterior los niveles de concentración del nutriente deben estar dentro de unos valores deseados para impedir que se generen efectos adversos bien por la falta o por exceso del NFA. Los valores considerados apropiados para una concentración de NFA que permita un buen

desempeño de la fermentación se encuentran en un rango alrededor de los 120 a 180 mg/L (Boudreau et al., 2017; Muñoz y Tobeña, 2013; Correia, 2011); no hay un consenso entre autores para este rango, ya que algunos consideran valores un tanto diferentes con incluso un mínimo necesario de 100 mg/L frente a otros que mencionan valores superiores al máximo del rango indicado anteriormente; sin embargo en general se puede decir que los valores están alrededor de los 140 mg/L (Casalta et al. 2013; Lallemand, 2015; Ugliano, Henschke, Herdrich y Pretorius, 2007). Los niveles óptimos de NFA diferirán de una fermentación a otra, debido a las cepas de levadura, los contenidos de azúcar en el mosto e incluso por el tipo de mosto (Hill y Stewart, 2019).

Cuando los valores de NFA no se hallan apropiadamente, es recomendado hacer adición de una fuente externa de nitrógeno para garantizar que exista una fermentación óptima. La adición exógena del nutriente se hace necesaria para asegurar la fermentación y la calidad del producto final; lo cual se ha convertido en una práctica habitual. Para suplementar el nutriente, es recomendado adición de fuentes de nitrógeno en su forma inorgánica como sales amoniacales, por ejemplo: fosfato diamónico, sulfato amónico, o bisulfito amónico; también pueden adicionarse algunas fuentes de tipo orgánico como proteínas, péptidos o incluso levadura inactiva y autolisado de levadura (Muñoz y Tobeña, 2013, Hidalgo, 2018; Ugliano et al., 2007).

De modo que a partir de una determinación del NFA en un sustrato o medio se define si existe necesidad de añadir una fuente externa, para suplir la necesidad, lo que permite establecer cantidades a añadir o en su defecto determinar que la cantidad existente es suficiente y no incurrir en adiciones innecesarias que puedan generar efectos negativos e incrementar los gastos.

Importancia de la Determinación de NFA en la Industria del Etanol Carburante.

Dado que el NFA juega un papel importante en el desarrollo de la fermentación, la determinación de la concentración en el medio permite controlar esta variable a fin de evitar que una carencia o exceso afecte adversamente el proceso de fermentación y por consiguiente el rendimiento de la producción de etanol. Como el producto final es el alcohol etílico, el objetivo en la fermentación será la transformación de todos los azúcares fermentables disponibles en etanol; en este caso características organolépticas como sabores o aromas no resultan relevantes y se busca generar el mayor rendimiento de transformación de los azúcares en este único producto final, el etanol. Por ello la cuantificación estará enfocada en determinar si es necesario hacer algún tipo de adición de nutrientes a fin de suministrar a la levadura el nitrógeno necesario para que la actividad metabólica y transformaciones bioquímicas sean adecuadas.

Determinar las necesidades de nitrógeno contribuye a no incurrir en exceso o carencia de la fuente de nitrógeno generando procesos fermentativos con buen rendimiento en la producción de etanol a razón del sustrato (materia prima) consumido e insumos añadidos, al igual que la productividad, relacionada con el volumen de producción de etanol a razón del tiempo que tarda en llevarse a cabo la fermentación y lo que ello implica, ya que fermentaciones más largas implican un mayor gasto energético por los sistemas de recirculación, refrigeración u otras operaciones a nivel industrial.

Descripción de los Métodos de Análisis Seleccionados

La descripción de cada método en estudio resulta útil para comprender la complejidad que puede acarrear su implementación; en esta sección, se indican las técnicas a partir de las cuáles se desarrollan, así como los principios sobre los cuáles están basados, mencionando de igual forma, aspectos sobre el desempeño de cada método, necesidad de equipos, reactivos y soluciones, así como aspectos de seguridad relacionados con la manipulación de insumos químicos.

Contenido:

Método de análisis de Formaldehído

Método de análisis de Ninhidrina

Método de análisis de OPA- Enzimático

Método de análisis HPLC

Método de análisis FT-IR

Consideración de Costos

Método de Análisis de Formaldehído

Este método de análisis es conocido también bajo el nombre método de formol o método de Sörensen, además se hallan textos donde es llamado titulación de formol o índice de formaldehído.

Técnica Analítica Empleada

Para el desarrollo del método de análisis de formaldehído, son empleadas dos técnicas analíticas; la potenciometría y la volumetría. La potenciometría es aplicada a través de la determinación constante de las unidades de pH que permiten indicar el grado de acidez o basicidad de las soluciones implicadas en el análisis las cuales pueden hallarse dentro de la escala 0 a 14 (unidades de pH) y mediante la volumetría o titulación volumétrica se cuantifica el volumen de reactivo (titulante) consumido hasta determinar el punto de equivalencia química.

La potenciometría es una técnica electroquímica, que se basa en la medición de la diferencia de potencial (voltaje) que aparece entre dos electrodos introducidos en una solución, donde cada electrodo cumple una función para establecer dicha diferencia; un electrodo denominado de referencia tiene un potencial conocido que es fijo, e independientemente del medio donde sea sumergido no cambia, el otro electrodo es llamado indicador, cuyo potencial depende del logaritmo de la concentración del analito que debe medirse en la muestra (González, 2019; Trujillo, Vega, y Barajas, 2014). Estos electrodos están conectados a un voltímetro, que se encarga de medir la diferencia de potencial que se dé entre los dos electrodos, para lo cual, el

electrodo de referencia cuya membrana porosa se conecta a él espécimen que debe medirse cierra el circuito.

Para la determinación del pH en el método de formaldehído es empleado un electrodo, que permite medir mediante la diferencia de potencial las unidades de pH de cada solución, el electrodo usado presenta una membrana de vidrio; consta de una varilla de AgCl sumergida en solución de 0,1 normal (N) de ácido clorhídrico (HCl), el extremo está conformado por la membrana sensible a los iones H^+ , combinado con un electrodo de referencia que se encarga de proporcionar la diferencia de potencial (González, 2010). Midiendo el potencial se puede obtener una concentración o seguir la evolución de una reacción química como en el caso de las titulaciones; en este método el seguimiento se hace sobre el formaldehído, la muestra analizada (material fermentado o materia prima) y la mezcla de ambos, específicamente se mide el pH mientras se realiza adición de un reactivo alcalino hasta alcanzar un punto específico (pH 8,0).

Por su parte la volumetría; técnica cuantitativa de adición de volúmenes que consiste en determinar un volumen de una solución cuya concentración es conocida (solución valorada), que ha sido requerida en la reacción química con un volumen conocido de una sustancia; es empleada para la adición del reactivo titulante (Hidróxido de sodio) desde una bureta sobre la muestra a analizar hasta llevar a un punto final; el cual es determinado mediante la medición del pH; en este punto final se da una equivalencia química producida por la reacción química del titulante con el analito.

El uso del principio potenciométrico mediante la determinación de pH, junto con la titulación para establecer el volumen de titulante empleado, permite el desarrollo del método de formaldehído.

Principio del Método de Análisis

Se trata de un método relativamente simple; probablemente el más conocido en las bodegas de vino; ya que muchos documentos relacionados con la industria vinícola mencionan este método como el indicado para determinar el nitrógeno fácilmente asimilable.

El método de formaldehído consiste en una titulación volumétrica con uso de pH-metro para establecer el punto final.

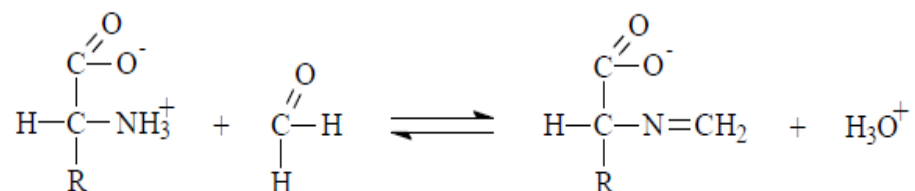
La muestra a analizar es neutralizada usando para ello solución de Hidróxido de Sodio 1N y finalmente con 0,1 N hasta pH 8,0 luego de lo cual es añadido formaldehído (HCHO) que también ha sido neutralizado a pH 8,0; a continuación, la muestra es titulada con solución de Hidróxido de Sodio 0,1 N (NaOH) hasta pH 8,0 (Assis da Veiga, 2014).

El formaldehído al entrar en contacto con el nitrógeno fácilmente asimilable bloquea la función amina y los iones amonio, lo cual genera en el primer caso que se libere un protón y un grupo metilo formado por el carboxilo de los aminoácidos, pero que ha perdido el grupo amina ($-\text{NH}_2$), se bloquea al ion NH_4^+ dejando las sales de amonio titular su ácido; por lo cual en la solución se genera un descenso de pH el cual luego es titulado con la solución de NaOH (Skoutelas, Ricardo-da-Silva y Laureano, 2011; Escuela de Vitivinicultura Presidente Tomás Berreta, 2013).

Se usa la potenciometría mediante el pH-metro para comprobar el descenso de pH causado por la liberación de hidrogeniones, al igual que luego cuando es titulado gota a gota con NaOH, es mediante el pH-metro que se establece punto final de la reacción cuando se alcanza un pH de 8,0. Se considera que la disminución del pH es proporcional a la cantidad de los compuestos nitrogenados presentes; y mediante el volumen de base utilizado se puede calcular el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable (Muñoz y Tobeña, 2013). En la Ilustración 2 puede observarse la reacción.

Ilustración 2.

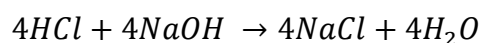
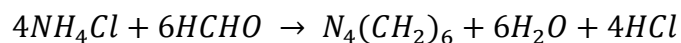
Reacción química formaldehído y aminoácido.



Nota. Adaptado de Guías Prácticas de (A.C.M.V.) Análisis y Control de Mostos y Vinos (p. 107), por Escuela de Vitivinicultura Presidente Tomás Berreta, 2013.

La adición del formaldehído (Ilustración 2) en exceso bloquea la función amina produciendo ácido, el derivado formado no posee el grupo básico (-NH₂) generando un descenso de pH, que luego es titulado con la adición de hidróxido de sodio.

Se puede considerar otra reacción partiendo de una fuente inorgánica de nitrógeno para indicar lo que sucede en la reacción a partir de los iones amonio (Cloruro de Amonio como fuente de NH_4^+ , el cual podría hallarse en una muestra por la adición exógena de dicho compuesto para suplir carencias de nitrógeno en la fermentación.):



Ecuación 1. Reacción química formaldehído + fuente de nitrógeno inorgánico

Una vez desarrollada la titulación, el volumen de titulante es usado para el cálculo de la concentración de NFA, mediante la ecuación:

$$\frac{\text{mgN}}{\text{L}} = \frac{\text{mL NaOH} * \text{Concentración NaOH} * 1000 * 14}{\text{mL Muestra}}$$

Ecuación 2. Cálculo de concentración de NFA, método formaldehído.

Donde:

mL NaOH: Se refiere a los mililitros de solución de NaOH (valorada) consumido en la titulación

Concentración NaOH: expresada en unidades de Normalidad.

La muestra a analizar debe ser filtrada o centrifugada para eliminar posibles partículas sólidas en suspensión.

Características de Desempeño del Método

Dado que el método de análisis es aplicado para una cuantificación del analito; es conveniente considerar las características del método que indique si este permite generar resultados confiables, ver si produce resultados de medida apropiados para el uso previsto; en ese sentido toda característica relacionada a la calidad del método y la seguridad del mismo son consideradas a continuación:

La cuantificación de NFA considera los compuestos que la levadura puede asimilar y metabolizar; respecto a ello, autores coinciden indicando que se trata únicamente de las fuentes bajo la forma aminoácidos y amonio.

Respecto al método de formaldehído Dukes y Butzke (como se citó en Casalta et al., 2013) indican que “La prolina y la hidroxiprolina que no son asimiladas por las levaduras durante la fermentación no son detectadas por este método” (p.272). Sin embargo, en estudios posteriores se ha determinado que el método de formol presenta algunas inconvenientes; Muñoz y Tobeña (2013) afirman que “la valoración con formaldehído mide parcialmente la prolina aminoácido que no forma parte del NFA” (p.40); Gump et al. (citado por Muñoz y Tobeña, 2013) mencionan que el método de formaldehído subestima parcialmente algunos aminoácidos y que la respuesta del método frente a la prolina titula aproximadamente un 17% de la prolina disponible en la muestra. Como se puede observar existen características que pueden dar indicación de un problema respecto a la idoneidad del método para determinar únicamente las fracciones de nitrógeno que son de interés.

Como aspecto positivo, los resultados de análisis de robustez del método frente a afectación por las variaciones de pH, muestra una buena respuesta al no verse afectado; al igual

que responde con un 81,54% y un 91,27 % de recuperación del analito frente a muestras de solución modelo de amonio y arginina respectivamente (Skoutelas et al., 2011).

“El método formol incorpora titulación de amonio (aprox. 77% a 88%) y otros aminoácidos como arginina (aproximadamente del 90% al 98%)”(Skoutelas et al., 2011, p.265). En concordancia con los datos antes expuestos, otro estudio indica porcentajes de recuperación del analito de 82,86% para amonio partiendo de solución estándar a base de DAP (fosfato diamónico).

También se considera la selectividad del método, relacionada con el grado en que este se puede ver afectado por los componentes de la muestra; la presencia de dióxido de azufre (SO_2) dentro del material fermentado puede generar interferencias en el resultado, debido a que este puede reaccionar con el hidróxido de sodio para formar sulfito de sodio; por ello se recomienda la adición de unas gotas peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre la muestra a analizar antes de realizar el ajuste de pH (Hidalgo, 2018). El dióxido de azufre al estar en un medio acuoso forma ácido sulfuroso y se disocia en ion bisulfito (HSO_3^-) y ion sulfito (SO_3^-); y esta disociación variará según el pH del medio de tal forma que se puede desplazar hacia la formación de sulfito en pH alto y hacia ácido sulfuroso en pH bajo (Escuela de Vitivinicultura Presidente Tomas Berreta, 2013).

Aspectos de Seguridad y Salud

Conviene considerar aspectos de seguridad y salud con relación a equipos y reactivos que deban ser usados, así como los cuidados o precauciones que deban tenerse.

En este caso, el uso de formaldehído en el método representa un riesgo para la salud, ya que, está clasificado como sustancia peligrosa porque puede provocar cáncer, provocar defectos genéticos, dañar órganos y generar otras afectaciones a la salud. Esta característica es una desventaja dado que el análisis requiere de constante contacto con la sustancia en mención; claramente el desarrollo del método lleva consigo cuidados y precauciones a aplicar, mediante lo cual se puede reducir los riesgos.

Método de Análisis de Ninhidrina

Se trata de un método colorimétrico recomendado por la EBC para la determinación del FAN en cervecería, el método fue testeado por la EBC en 1973 donde se determinó que es altamente reproducible, ha sido un método empleado por más de 40 años y ha sido adoptado como un método oficial por organizaciones de cervecería (Spedding, 2013; Lie, 1973).

Técnica Analítica Empleada

La técnica empleada en este método de análisis es la espectrofotometría; la muestra tratada es analizada a determinada longitud de onda para establecer el contenido de NFA.

La espectrofotometría es una rama de la química analítica que se ocupa de estudiar las interacciones que se dan entre la radiación electromagnética con la materia; en ese orden se estudian las propiedades de los materiales y se cuantifican especies químicas; todo esto se lleva a cabo mediante la medición de luz que es absorbida, emitida, reflejada o dispersada por el material (Prasad, 2020).

El estudio de la interacción entre los átomos o moléculas de la materia con la radiación es llamada espectroscopia; la cual utiliza radiación electromagnética (luz) de ciertas regiones del espectro (es decir a determinadas longitudes de onda) para interactuar con moléculas de una muestra; en ese orden las moléculas pueden absorber una porción de luz, en ciertas longitudes de onda, mientras que otra es reflejada; la muestra interacciona con la luz y la modifica, esto se da gracias a las interacciones de los fotones, partículas elementales de la luz, con los átomos de las sustancias presentes en la muestra, lo cual es fundamentado en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones (Khan Academy, 2021; Castellanos, Velandia, González, Varela y Ramirez, 2018; Mettler Toledo, 2016).

Estas interacciones de una muestra con la luz permite a través de la espectrofotometría determinar la concentración de una sustancia; la ley de la espectrofotometría o ley de Bouguer-Lambert-Beer brinda los fundamentos físico-matemáticos para determinar la concentración de una sustancia, lo cual se logra mediante el conocimiento de la cantidad de luz absorbida, la potencia media radiante que incida en la muestra y la potencia transmitida (Vargas y Loaiza, 2011).

La ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon cd$$

Ecuación 3. Ley de Lambert-Beer

Donde:

A La absorbancia

ϵ El coeficiente de extinción o absortividad en L/(cm*mol) o mL/(cm*g)

c La concentración de la muestra; se da en mol/L o g/mL

d Longitud del camino de la cubeta en centímetros

Un haz de luz pasará por una cubeta que contiene muestra; la luz se atenuará proporcionalmente a la concentración de la muestra y a la longitud de la cubeta. En ese orden la absorbancia depende de la concentración y de la longitud de la cubeta (Mettler Toledo, 2016).

La concentración de la muestra se podrá determinar a partir de la absorbancia:

$$c = \frac{A}{\epsilon * d}$$

Ecuación 4. Concentración según valores de absorbancia medidos

La longitud de onda empleada en este método es de 540 nm; es decir que se halla en la región del visible (VIS); aquí la muestra se ilumina con rayos electromagnéticos de diferentes longitudes de onda en el visible (400-700 nm); la luz será absorbida parcialmente por algunas moléculas presentes en la muestra, mientras que habrá una porción de luz transmitida la cual será registrada mediante un detector.

Es importante mencionar que la mayoría de aminoácidos y compuestos amino dentro de la muestra a analizar no presentan grupos absorbentes fuertes en el rango ultravioleta visible (Koga, Miyoshi, Todoroki y Hamase, 2017); por tanto, la muestra debe ser tratada a fin de permitir que la interacción de la luz con los analitos de interés sea suficientemente sensible para generar la atenuación de la luz incidente; para ello la muestra es tratada con el reactivo ninhidrina la cual forma compuestos coloreados (cromóforos, responsables de la absorción de luz por una molécula) característicos con el grupo α -amino de los aminoácidos primarios, el cromóforo formado es el mismo para todos los aminoácidos primarios y la intensidad del color

formado dependerá de la cantidad y naturaleza química de dichos grupos amino (Perrett y Nayuni, 2014).

Una vez desarrollado el color en la muestra ésta es llevada al espectrofotómetro; este equipo presenta generalmente cuatro componentes: una fuente de luz, el soporte donde se introducen las muestras (cubeta), un dispositivo para separar las longitudes de onda de la luz y un detector.

En el desarrollo práctico de una medición o determinación de la absorbancia en una muestra, se requieren los siguientes pasos:

- Determinar un blanco, lo cual implica medir la intensidad de la luz transmitida a través del solvente a emplear, deponiéndolo en un recipiente que no absorbe (cubeta o celda).
- La intensidad de la luz transmitida a través de la cubeta que contiene el blanco es medida por el detector.
- Luego la muestra disuelta en el solvente se dispone en la cubeta, entonces el haz de luz pasa a través de la cubeta, en este paso la luz es parcialmente absorbida por las moléculas que se hallan en la muestra.
- La luz transmitida es medida por el detector
- Se habrá generado un cambio en la intensidad de la luz; lo cual se calcula dividiendo la intensidad de la luz transmitida de la muestra por los valores que se midieron con el blanco; esta relación se almacena por el registrador (Mettler Toledo, 2016).

Principio del método de análisis

El método de análisis se fundamenta en la absorción de la luz por una muestra; pero para llevar al espectrofotómetro la muestra previamente es acondicionada a fin de generar una coloración violeta que responde a la presencia del analito de interés y que permitirá determinar su concentración; para lo cual se debe considerar los siguientes aspectos:

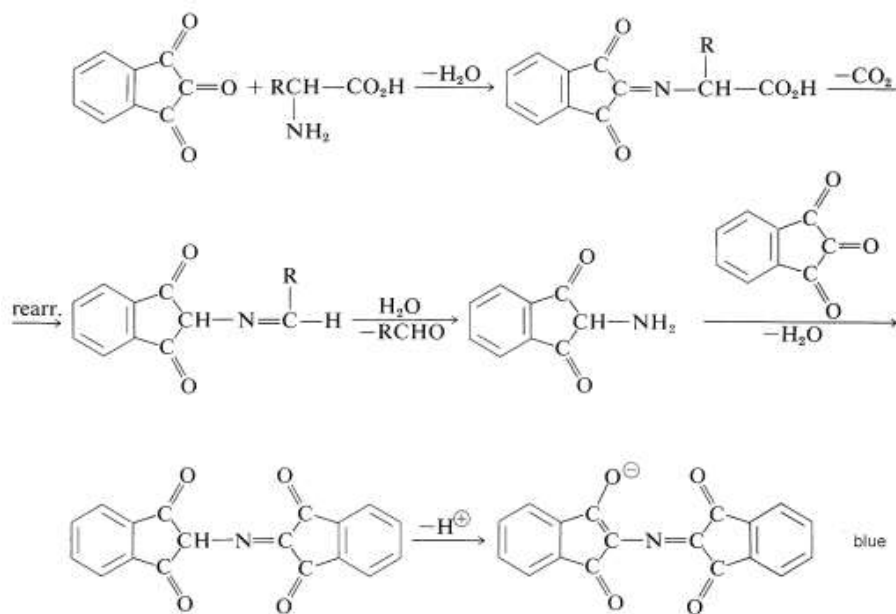
- La muestra debe ser homogenizada efectivamente; en el caso del mosto fermentado debe retirarse el CO₂ (Dióxido de carbono) agitando vigorosamente unos minutos y luego filtrando a través de papel filtro; al igual que toda muestra a analizar debe filtrarse a fin de eliminar partículas en suspensión.
- Preparar con anterioridad los reactivos requeridos, como lo es la ninhidrina, la solución de dilución y la solución del estándar, la cual es comúnmente glicina.
- La solución de ninhidrina debe hallarse a un pH entre 6,6 y 6,8; si es necesario ajustar usar ácido clorhídrico 6 mol/l o disolución de hidróxido de sodio 4 mol/l (Merck KGaA, 2020).
- Como parte del procedimiento la porción de muestra a usar es diluida para asegurar una concentración de aproximadamente 1 a 3 mg/L de amino nitrógeno.

Los compuestos nitrogenados como los grupos amino primarios, fuentes de NFA para la levadura, reaccionan con la ninhidrina generando una coloración violeta/purpura conocido como purpura de Ruhemann; la intensidad de color dependerá del número y la naturaleza química de los grupos amino presentes en la muestra; luego la muestra es llevada a un espectrofotómetro para la lectura de su absorbancia a 570 nm (Hill y Stewart, 2019; Perrett y Nayuni, 2014).

Las reacciones que se desarrollan con la formación del color se observan en la Ilustración 3, donde partiendo del indano-1,2,3-triona (ninhidrina en equilibrio en solución acuosa) y un aminoácido en solución, se generan diversas reacciones que van formando productos intermedios hasta formar el compuesto coloreado típico; inicialmente las reacciones conllevan la formación de una imina primaria que luego es descarboxilada, luego en un compuesto intermedio se observa un molécula libre de agua y un grupo aldehído, formándose a continuación un compuesto que contiene el grupo funcional amina, este intermedio reacciona con otra molécula de indano-1,2,3-triona, se libera nuevamente un molécula de agua y se forma un complejo coloreado azul/violeta denominado púrpura de Ruhemann. De acuerdo con Yokoyama y Hiramatsu (2003) este compuesto coloreado se atribuye al anión de dicetohidrindiliden-dicetohidrindamina.

Ilustración 3

Secuencia de formación del color



Nota. Adaptado de *Analysis of Amino Acids*, por J. D. Roberts y M. C. Caserio, 2021, Chemistry

Libretexts (<https://chem.libretexts.org/>).

Para el desarrollo del método y generar la reacción de ninhidrina con los aminoácidos se debe contar con varios reactivos:

El reactivo de color, que debe prepararse usando 0,5 g de Ninhidrina (2,2-dihidroxiindeno-1,3-diona; $C_9H_6O_4$), 10 g de di-Sodio hidrogenofosfato dodecahidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 6,0 g potasio dihidrogenofosfato (KH_2PO_4), 0,3 g de fructosa ($C_6H_{12}O_6$), los cuales deben diluirse en 100 ml de agua; la solución resultante debe hallarse a un pH de 6,6 a 6,8.

Una solución de disolución, para la cual mezclar 2 g de Yoduro de Potasio (KIO_3) en 600 mL de agua, a lo cual añadir 400 ml de etanol; esta solución debe permanecer almacenada a $5^\circ C$.

Se debe contar con una solución estándar para calibración, para lo cual disolver 107,2 mg de glicina a 100 mL, esta es una solución de stock, debe almacenarse a $0^\circ C$; a partir de esta solución se preparará la solución de trabajo la cual debe prepararse cada vez que se va a llevar a cabo un análisis, debe tomarse 1 mL de la solución stock y disolver a 100 mL con agua. Esta solución final contendrá 2mg/L de α -amino nitrógeno. (EBC Analytica, 2015; Geisler y Weiß, 2015).

La muestra, previamente filtrada y diluida, es analizada en el espectrofotómetro determinando su absorbancia (A) a 570 nm, de igual forma se lleva a cabo el análisis para el blanco y el estándar; registrándose los valores de A de las 3 especies analizadas: muestra, blanco y estándar, estos valores se emplean (Ecuación 5) para calcular la concentración de nitrógeno asimilable en la muestra.

$$\text{Free amino nitrogen} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A_M - A_B}{A_E - A_B} * 2 * F$$

Ecuación 5. Cálculo de Amino nitrógeno libre, método Ninhidrina. Fuente, EBC Analytica (2015); Geisler y Weiß (2015)

Donde:

A_M = Valor de absorbancia de la muestra

A_B = Valor de absorbancia en el blanco (H₂O)

A_E = Valor de absorbancia en el estándar

F = Factor de dilución de la muestra

Durante en análisis se generan varias reacciones entre la muestra y los reactivos añadidos; la ninhidrina es un agente oxidante que causa la descarboxilación oxidativa del α -aminoácido presente en la muestra y produce dióxido de carbono, amoníaco y un aldehído con un átomo de carbono menos del original; luego la ninhidrina reducida y otra molécula de ninhidrina reaccionan con el amoníaco para formar un producto de color azul-violeta (Sharma y Riyat, 2015). La reacción se lleva a cabo en caliente; la fructosa es incluida en la preparación de la solución por su capacidad reductora; mientras que la composición de la solución de dilución (KIO₃) es añadida luego de enfriar, permite que la ninhidrina se mantenga oxidada y no ocurra más reacción de color; la molécula final es un anión que consta de dos moléculas de ninhidrina, cada una de ellas sin sus grupos hidroxilo y unidas por un nitrógeno central (Spedding, 2013; Lie, 1973).

Características de Desempeño del Método

El método de ninhidrina es comúnmente empleado en la industria cervecera; este método ha sido estudiado por varias asociaciones de cerveceros en el mundo como la ASBC y EBC, incluso la AOAC International (2005) establece como método estándar de análisis el ensayo de ninhidrina para la determinación de amino nitrógeno libre en cerveza y mosto. Si bien este método está más asociado a la industria de la cerveza, también ha sido considerado para la determinación de NFA en mostos relacionados a productos como vino, sidra y etanol.

EBC describe el método como altamente reproducible, pero, aunque el alcance del método indica que determina el contenido de nitrógeno amínico libre a partir de aminoácidos, amoníaco y grupos de nitrógeno α -amino terminales de péptidos y proteínas; se sabe que la prolina y la hidroxiprolina, aunque no reaccionan con la ninhidrina para dar coloración azul, presentan una reacción para dar compuestos color amarillo, lo cual genera que la prolina se estime parcialmente a la longitud de onda empleada (EBC Analytica, 2015; Koga et al., 2017). Adicional el ácido γ -aminobutírico que se halla presente en mostos de uvas y también en cerveza, puede reaccionar con la ninhidrina; EBC Analytica, (2015) indica “El método no es específico para α -amino nitrógeno dado que el ácido γ -butírico que está presente en el mosto da una reacción de color con la ninhidrina” (p. 1); este aminoácido no proteico ha sido detectado anteriormente mediante la cromatografía de papel con uso de la ninhidrina mezclada en el solvente, la cual genera un efecto en el rendimiento del color (Li, Qui, Cao, Yang y Huang, 2009).

Si bien este método se emplea con mayor frecuencia en la industria de la cerveza, también ha sido considerado en otras matrices que implican procesos fermentativos; es el caso de la industria del vino, para la cual Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, (2007) desarrollaron un estudio donde comparan el método de ninhidrina junto con otros de los métodos existentes para evaluar el contenido de nitrógeno asimilable en el jugo de uva, en el cual indican “La existencia de métodos rápidos, exactos y precisos de determinación de nitrógeno asimilable constituiría de hecho una herramienta valiosa para los enólogos. Se suelen utilizar varios métodos analíticos. Sin embargo, su calidad analítica no se conoce suficientemente” (p.1272). A partir del estudio se estableció que el método ninhidrina denominado en este caso como método FAN, presenta un límite de detección bajo de 18,1 mg N/L; se pudo observar que la ninhidrina presenta una reacción de formación de color con el amonio, el cual también es considerado como fuente de nitrógeno asimilable por la levadura; sin embargo, su porcentaje de recuperación está alrededor del 32 %, frente a una recuperación promedio del 90 % de fuentes de nitrógeno a partir de aminoácidos. La precisión del método en condiciones de repetibilidad arrojó desviaciones estándar de ± 5 mgN/L con coeficientes de variación CV% entre 2,2, a 2,9 %. Por otra parte, en relación con la prolina, se confirma una baja linealidad en la respuesta y baja tasa de recuperación (Filipe-Ribeiro & Mendes-Faia, 2007).

Existe una limitada disponibilidad de información sobre el método; y tanto ASBC como EBC, quienes recomendaron el método, ofrecen poca información en relación a aspectos de desempeño del método; aun así, a partir de sus estudios desarrollados en la década de los 70 mencionan su ventaja debido a que muestra una menor interferencia y genera resultados altamente reproducibles; Lie (1973) indica “la selección del método de ninhidrina como método

estándar EBC se basó en una evaluación de la reproducibilidad entre laboratorios (...) se observó un coeficiente de variación entre 5 y 6% con desviaciones estándar variables de ± 3.5 hasta $\pm 8,4$ para muestras de cerveza y mosto” (p.39).

El desarrollo del método se considera sencillo; basta con seguir las indicaciones paso a paso. Los reactivos requeridos son pocos y claramente es necesario contar con un espectrofotómetro; inclusive muchos fabricantes de estos equipos ofrecen software, reactivos ya listos y accesorios para el desarrollo del método.

El método requiere que condiciones como temperatura y tiempos indicados sean respetados ya que se considera que estas variables pueden ser críticos; al igual que se debe incluir siempre una muestra de estándar y un blanco para cada prueba a fin de compensar las variaciones de temperatura (EBC Analytica, 2015).

Aspectos de Seguridad y Salud

Dentro de los reactivos empleados en el desarrollo del método, la ninhidrina y el yoduro de potasio resultan ser a los que atañe o se da mayor relevancia en relación a sus peligros; estos dos reactivos son los que presentan una clasificación de peligrosidad, dado que los demás reactivos no están considerados como peligrosos y sólo algunos reciben consejo de prudencia en su uso.

El yoduro de potasio y la ninhidrina son clasificados como tóxicos; específicamente la ninhidrina recibe la clasificación de toxicidad aguda Categoría 4, Oral; a su vez el yoduro de

potasio es clasificado con toxicidad específica en órganos por exposiciones repetidas, categoría 1, oral, Tiroides. En general presentan efectos toxicológicos tras ingestión vía oral, por inhalación y efectos adversos tras contacto con la piel y ojos (Merck KgaA, 2017)

Método de Análisis de OPA- Enzimático

El método es realmente la combinación de dos métodos de análisis; utilizados para determinar el NFA; un método es colorimétrico con el cual se determinan el nitrógeno amínico primario (proveniente de los aminoácidos) utilizando el colorante o-ftaldialdehído (OPA) y el otro método basado en una reacción enzimática determina el amonio presente utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa; la suma de los dos componentes expresados en mg N/L indican la concentración de NFA en una muestra (Muñoz y Tobeña, 2013). Tras el desarrollo del tratamiento de la muestra, la adición de reactivos y las reacciones químicas desarrolladas, ambos métodos miden espectrofotométricamente la concentración de cada analito.

Técnica Analítica Empleada

Esta combinación de métodos emplea para la cuantificación una misma técnica analítica, la espectrofotometría; basada en la interacción de la materia con la radiación electromagnética, utilizando longitudes de onda en el rango del UV-VIS. En la medida para OPA usan una longitud de onda de 335 nm, la cual se halla en el rango del espectro correspondiente al UV, junto al método enzimático cuya longitud de onda para la lectura es igual, aunque en algunos casos se sugiere una longitud de onda de 340 nm para ambos compuestos.

La espectrofotometría permite determinar la concentración de un compuesto en una solución; la interacción que se da entre las moléculas del analito (compuesto de interés) con la luz permite el desarrollo del análisis; las moléculas de acuerdo a su estructura pueden absorber cierta cantidad de radiación, aunque también puede suceder que la radiación sea dispersada o reemitida con un cambio o no de la longitud de onda, incluso la muestra puede emitir radiación. Cuando la luz interacciona con las moléculas, sus átomos pueden pasar a un estado activado durante un periodo de tiempo para regresar a su estado fundamental, es este proceso ceden la energía absorbida en forma de calor o en forma de fotones de la misma longitud de onda o menor (Hernández y Pérez; 2002).

Sobre la técnica analítica se abordó el tema en el método de Ninhidrina en el numeral 2.2.1.

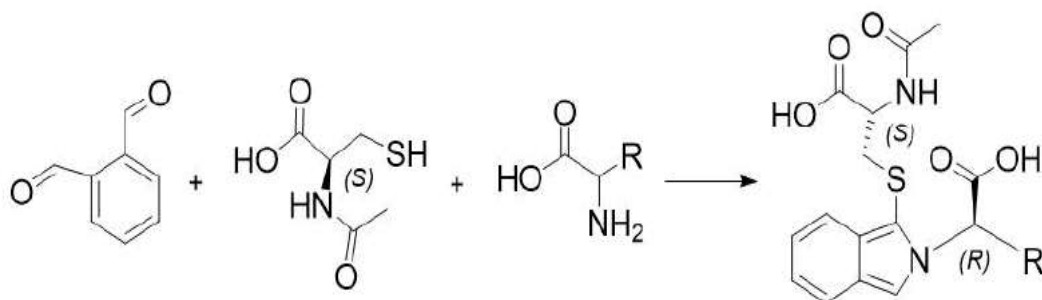
Principio del Método de Análisis

Para describir el principio del método, dado que se trata de la combinación de dos métodos, se describirá cada uno en separado:

Método OPA. También llamado NOPA, se trata de un método colorimétrico donde en presencia de un buffer alcalino, el o-ftaldialdehído (OPA) y la N-acetilcisteína (NAC), reaccionan con el aminoácido primario formando complejos coloreados, un isoindol el cual presenta su máxima absorbancia a 340 nm (Suriñach, 2017; Vintessential Laboratories, 2013) (Ilustración 4).

Ilustración 4:

Reacción de OPA en determinación de alfa amino nitrógeno



Nota: Adaptado de Method validation of enzymatic ammonia method and colorimetric free amino nitrogen method applied to wine industry (p.13) por A. Suriñach, 2017, *Universitat de Barcelona*.

El método se basa en la derivatización de los grupos amino primarios presentes en la muestra; lo que se busca con la derivatización es una transformación del compuesto químico de interés en otro similar, alterando algunos grupos funcionales para cambiar su reactividad o una propiedad física (Castillo, Carballo y Ramirez, 2019); para este caso, implica una serie de reacciones químicas a partir de la adición de reactivos que generan la transformación de los analitos en compuestos coloreados formando derivados de isoindol; el compuesto resultante se puede medir espectrofotométricamente; en condiciones óptimas los complejos cromogénicos (compuesto que contiene un grupo formador de color) formados son proporcionales estequiométricamente a la concentración del nitrógeno alfa-amino en la muestra (Otama et al., 2015; Biosystems S.A., 2020; Megazyme, 2012)

Empleando OPA en presencia de un tiol se generan los isoindoles; el OPA presenta rapidez en la formación de compuestos fluorescentes con los aminoácidos, no presenta

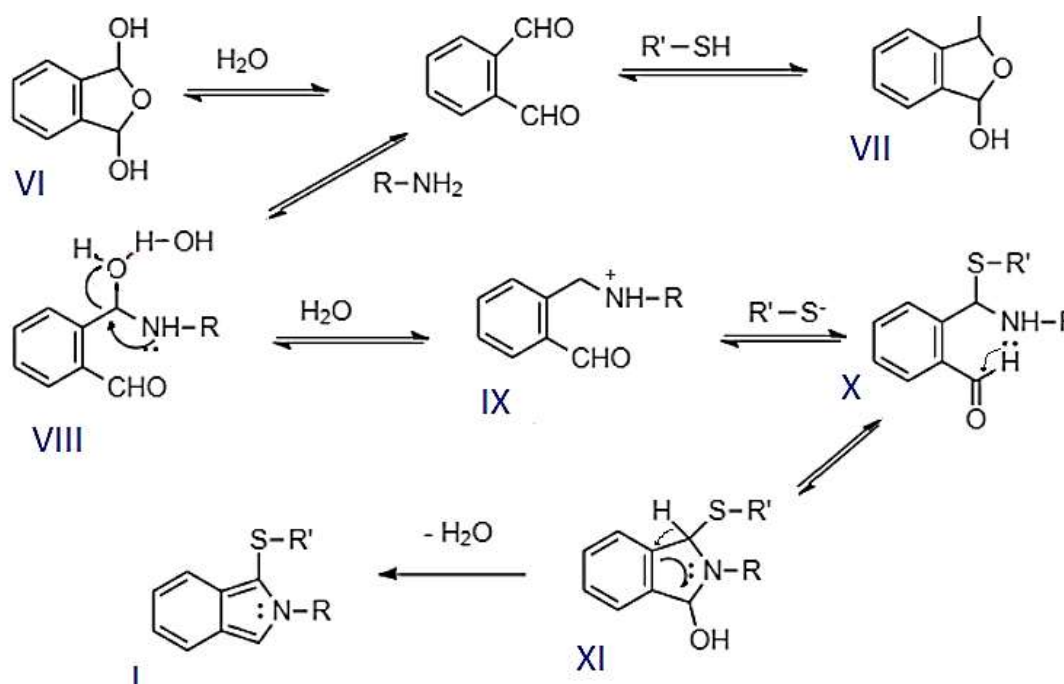
fluorescencia intrínseca y no se descompone fácilmente (Hernández 1988). El tiol usado es NAC, aunque anteriormente era usado el tiol mercaptoetanol, pero, NAC presenta ventajas sobre otros tioles al mostrar una formación casi instantánea de los derivados, gran estabilidad de estos y su absorbancia permanece constante por al menos 1 hora (Hernández, Villanueva y Álvarez-Coque, 1990).

El mecanismo de reacción de OPA con un tiol (Ilustración 5) es según Sternson et, al. (como se citó en Hernández, 1988):

Las disoluciones acuosas de OPA se hallan en equilibrio con una forma cíclica hidratada (VI), y en presencia de un tiol originan una reacción reversible que da lugar a un producto de adición cíclico (VII) (...), la amina primaria reaccionará rápidamente con la forma libre del OPA para formar carbinolamina (VIII), la cual se deshidrata para producir una imina protonada, altamente reactiva (IX). Esta última, a su vez, es rápidamente atacada por el anión tiol, formando un α -alquilaminobencilsulfuro (X). El ataque nucleofílico intramolecular de la amina secundaria resultante sobre el grupo carbonilo restante cierra el anillo, formando un producto intermedio (XI), que fácilmente se deshidrata para conducir al isoindol fluorescente (I). (p. 8)

Ilustración 5.

Mecanismo de reacción OPA-Tiol (Mercaptoetanol)



Nota: Adaptado de Estudió y aplicaciones analíticas de las reacciones de la cistina, cisteína y n-acetil-l-cisteína con él o-ftaldehído (p. 8), por Hernández, 1988, *Universitat de Valencia*.

Los reactivos involucrados en el procedimiento pueden ser preparados, pero en general en el mercado se ofrecen los kits compuestos por los reactivos listos para usar, incluido un estándar para calibración y control de calidad del método; este último puede variar entre Isoleucina o glicina.

Aunque en el mercado cada reactivo del kit está identificado de acuerdo a decisión del fabricante, sin informar a mayor profundidad sobre estos, en general los reactivos involucrados en la reacción son preparados como sugiere Hernández et al. (1990):

- Solución de o-ftaldialdehído, preparada en etanol y agua al 0,05 M

- Solución de N-acetilcisteína preparada en etanol y agua al 0,05 M
- Solución Buffer de ácido bórico-borato, se prepara disolviendo 6,18 g de ácido bórico y 2,8 g de NaOH en 1 litro de agua.
- Luego para su uso, debe prepararse el reactivo OPA-NAC-Buffer, para lo cual se mezclan 25 mL de OPA, 25 mL de NAC y 200 mL de Buffer.

En general los kits para OPA vienen asociados a un software y un equipo, lo que permite determinar fácilmente la concentración de amino nitrógeno libre de una muestra; el equipo determina automáticamente la concentración a partir de una curva de calibración y la lectura de la absorbancia de la muestra. A partir del kit de prueba de alfa-amino nitrógeno (NOPA) ofrecido por el fabricante Thermo Fisher Scientific, que a su vez es recomendado por EBC y mencionado por ASBC, describe el procedimiento de análisis en forma muy sencilla:

Tomar 200 μ L de Reactivo 1 (Reactivo que contiene Buffer con sustancias reductoras), se lleva a incubar junto con 2 μ L de muestra por 2 minutos, este es el blanco de la reacción, después se añaden 20 μ L de Reactivo 2 (Contiene OPA) se deja incubar por 5 minutos y se procede a medir a 340 nm, el método debe llevarse a cabo a 37 °C (Otama et al., 2015; EBC Analytica, 2017). Las proporciones de cada reactivo varía de acuerdo al fabricante del kit y el rango de concentración para el cual vienen dispuestos los reactivos; es así que Vintessential Laboratories (2013) emplean 2ml de buffer, 0,9 ml de NAC y 0,10 mL para OPA, empleando para los análisis 0,05 mL de muestra, además de lo anterior, este fabricante no emplea calentamiento para la reacción, ya que se desarrolla a temperatura ambiente; como se indicó antes, las proporciones de los reactivos en la adición, varían según indicaciones del fabricante del kit.

Para expresar la concentración de amino nitrógeno primario, los cálculos serán desarrollados de acuerdo a indicaciones del proveedor de reactivos; sin embargo, en general se debe establecer la absorbancia neta de la muestra; Megazyme (2012) describe, para hallar la concentración del analito en la muestra, se debe medir un blanco empleando agua destilada y desarrollando el análisis normalmente, posterior se analiza la muestra; para este caso específicamente considerar como absorbancia 1 (A_1) la medida una vez se añaden reactivo 1 más la muestra (o blanco) más el tiempo de reacción; posterior se añade el reactivo 2 se da tiempo a la reacción y se mide nuevamente la absorbancia (A_2) (tanto para el blanco como para la muestra). Se determina entonces la diferencia de las absorbancias ($A_2 - A_1$) tanto para el blanco como para la muestra, luego debe substraerse el valor de la diferencia resultado del blanco a la diferencia de absorbancias de la muestra a fin de obtener ΔA_{PAN} , el valor de ΔA_{PAN} debe ser al menos 0,100 unidades de absorbancia a fin de que la medida sea lo suficientemente precisa. Para determinar la concentración de amino nitrógeno primario (PAN) se calculará teniendo en cuenta volumen final, peso molecular del nitrógeno, el coeficiente de extinción del isoindol derivado, la longitud de la cubeta y el volumen de la muestra (Megazyme, 2012)

La ecuación resumida para el cálculo será:

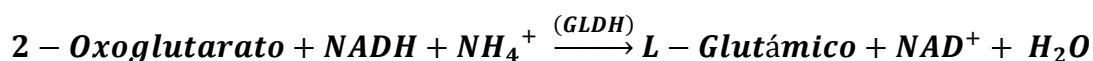
$$c = 129,74 \times \Delta A_{PAN}$$

Ecuación 6. Concentración amino nitrógeno- OPA, Fuente: Megazyme (2012)

Para eliminar materiales no deseados en la muestra y que puedan afectar el desarrollo de la reacción y por consiguiente la medición, la muestra a analizar debe hallarse libre de material en suspensión y desgasificada, por lo tanto, se recomienda un pretratamiento de la muestra realizando filtración, centrifugación o sedimentación en frío para las muestras turbias y desgasificar el dióxido de carbono según sea el caso, con agitación por 10 minutos.

Método Enzimático. Mediante el empleo de este método se determina la fracción de amonio (fracción mineral) presente en una muestra; usando para ello un kit enzimático; la enzima empleada es glutamato deshidrogenasa que cataliza la reacción que luego puede medirse espectrofotométricamente a 340 nm (Muñoz y Tobeña, 2013).

Este método consiste en la reducción de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) a NAD^+ (forma oxidada de NADH) en presencia de la enzima GLDH (glutamato deshidrogenasa), el ion amonio reacciona con el reactivo 2-Oxoglutarato (también conocido como α -cetoglutarato o ácido oxoglutárico) para formar ácido L-glutámico en medio ácido; la cantidad del NAD^+ formado es estequiométrico con la cantidad del amonio presente (Suriñach, 2017). La ecuación de la reacción es:



Ecuación 7. Reacción ion Amonio +Enzima GLDH

Li, Xu, Li Z., Wang T., y Wang C., (2020) expresan que:

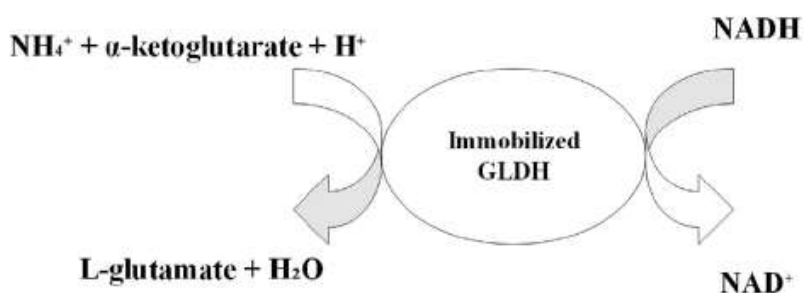
GLDH inmovilizado requiere una coenzima β -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y amonio para la conversión enzimática de α -cetoglutarato en ácido L-glutámico, (...) el

NADH se oxida para formar NAD^+ y la concentración de amonio puede ser medida indirectamente a partir del consumo de NADH monitoreado a una longitud de onda específica. (p.11) Ilustración 6.

El consumo de NADH genera un descenso en la absorbancia que es medida a la longitud de onda de 340 nm; con un tiempo de reacción de 2 minutos a 37°C o de 5 minutos a 25°C (Suriñach, 2017).

Ilustración 6.

Mecanismo ion amonio catalizado por GLDH



Nota. Adaptado de Detection methods of ammonia nitrogen in water: A review (p.11), por Li, Xu, Li z., Wang T. y Wang C, 2020, *Trends in Analytical Chemistry*.

Los reactivos involucrados en la reacción se hallan comercializados bajo identificaciones del fabricante, en algunos casos la información relacionada a concentración es limitada, sin embargo, en general los reactivos empleados en este método son:

- La enzima GLDH estabilizada y con los preservantes necesarios; según Megazyme (2005) quien comercializa Kits para este método, indica que el reactivo es: “ 2,2 mL, 475 U/mL” (p.3).

- El reactivo NADH, generalmente viene listo para diluir a determinado volumen, o en tabletas para añadir durante el análisis.
- La solución Buffer, esta se halla compuesta por tampón TEA 0,5M a pH 8,0, más imidazole (200 mM), 2-oxoglutarato (40mM) y azida de sodio 0,02 % (w/w) (Megazyme, 2020; Megazyme, 2005).
- Por supuesto es necesaria una solución estándar, que corresponde a una solución de amoniacó 5mL 0.04mg/mL preparado en azida de sodio al 0,02% w/v.

Para el desarrollo del análisis, se describen los siguientes pasos:

Añadir en la cubeta agua destilada, luego añadir la muestra, añadir la solución tampón TEA y NADH , se debe mezclar bien y esperar 2 minutos, llevar al espectrofotómetro para leer la absorción de estas soluciones a 340 nm (A_1), luego añadir la enzima GLDH, mezclar bien esperar 5 minutos y leer la absorbancia de las soluciones (A_2), en algunos casos puede que la reacción no haya finalizado, por tanto se recomienda volver a medir absorbancia a intervalos de 1 minuto hasta que los valores sean los mismos (Megazyme, 2020). Los pasos anteriores deben realizarse igualmente en una cubeta sin la adición de muestra, lo que corresponde a un Blanco.

Realizar el cálculo de la absorbancia neta, para lo cual se debe restar $A_1 - A_2$ tanto de la muestra como del blanco. A partir de los datos obtenidos, restar la absorción de la solución sin muestra (blanco) de la absorción de la muestra, de tal forma que se obtendrá la absorbancia real del amoniacó, en general dicha absorción deberá ser de al menos 0,100 unidades de absorción a fin de considerarse resultados precisos; un rango adecuado de absorbancia (Vintessential Laboratories, 2014; Megazyme, 2020).

Los cálculos a emplear para finalmente determinar la concentración del contenido de amoníaco varían de acuerdo al fabricante del kit de reactivos de análisis; dentro de los valores empleados para el cálculo tienen en cuenta el volumen de muestra, los centímetros del paso de luz, el coeficiente de extinción del NADH, entre otros datos; los que finalmente sintetizan en un valor constante, como por ejemplo Megazyme (2020) cuyas indicaciones para el cálculo son:

$$c = 0,07082 \times \Delta A_{\text{amoníaco}}$$

Ecuación 8. Cálculo concentración amoníaco método Enzimático

Para efectuar exitosamente la determinación, se recomienda que la muestra:

Este libre de materiales en suspensión; la muestra puede centrifugarse y filtrarse; en el caso de muestras muy coloreadas, se sugiere añadir aproximadamente 0,1g de PVPP (polivinilpolipirrolidona) y posterior de agitación realizar filtración en papel filtro; de igual forma las muestras que contengan CO₂ deben ser desgasificadas mediante agitación.

Se recomienda una concentración aproximada de amoníaco en la muestra que no se halle por encima del límite de linealidad del método, en tal caso se sugiere realizar diluciones con agua destilada, de igual forma puede suceder que en muestras con concentración muy baja se sugiera tomar un poco más de muestra (Vintessential Laboratories, 2014).

Características de Desempeño del Método

Para hablar del desempeño de estos métodos lo haremos por separado; dado que una cuantificación de NFA implica la suma tanto de la fuente de nitrógeno proveniente de amino nitrógeno libre como del amonio presente, si se garantiza que cada método es idóneo para cuantificar efectivamente los analitos, se puede deducir la idoneidad de los métodos combinados en la determinación del NFA.

De acuerdo a lo mencionado por EBC Analytica (2017) quienes al referirse al alcance del método OPA indican: “el método estima los aminoácidos midiendo los grupos de α -amino nitrógeno terminales de péptidos y proteínas. (...) es específico para el nitrógeno α -amino, no incluye prolina amoniaco o amonio” (p.1). En indicaciones similares se asegura que la L-prolina no reacciona con los reactivos empleados (OPA-NAC) en el método, ya que, ésta contiene un grupo amino secundario (Megazyme, 2012; Dukes, 2010).

Por su parte Suriñach (2017) al evaluar en su estudio el método OPA, mediante el uso del kit de reactivos y equipo asociado de TDI (Tecnología de Difusión Ibérica), reporta que el método presenta una excelente linealidad hasta una concentración de 250mg/L de Nitrógeno amínico, así como también en relación a la exactitud y precisión del método informa que este presenta un buen grado de concordancia entre los valores de los resultados y el valor real, y una buena precisión evaluada en términos de repetibilidad con desviaciones estándar relativas inferiores (RSD%) a 2 %.

Como se puede observar algunos textos atribuyen características de desempeño muy positivas al método; aun así hay algunas apreciaciones que conviene también analizar y que están relacionadas con la robustez del método; se menciona que debido a que en algunos casos es necesario realizar decoloraciones a muestras muy coloreadas podrían existir interferencias; Suriñach (2017) indica “estos resultados preliminares sugieren que en las muestras descoloridas se reduce el valor de la medición” (p.36). Para la observación anteriormente citada es de anotar que en el ensayo la decoloración se realizó con carbón activo; el cual podría estar arrastrando contenido del analito y por ello se nota una reducción en el valor de la medida.

En relación a los iones amonio, que como anteriormente se mencionó, también son fuente asimilable para la levadura y pueden hallarse en una muestra, pueden generar un pequeño aumento de la absorbancia, por lo que estos iones son considerados una interferencia, sin embargo esto puede desaparecer dentro de los primeros 10 minutos de la reacción de los reactivos con la muestra, por lo tanto se debe permitir que reaccionen durante 15 minutos antes de realizar la lectura de la absorbancia (Megazyme, 2012). Gump et al., (2002) indican que existe “una respuesta del 3,5 % para los iones amonio reportados en el procedimiento de NOPA” (p.328); este porcentaje no es considerado importante; a pesar de esto, será conveniente seguir las indicaciones mencionadas por Megazyme con relación al tiempo de reacción que deben tener las muestras a fin de asegurar que la posible presencia de los iones amonio no interfieran en la cuantificación de los α -amino nitrógeno.

Por su parte, el método enzimático, descrito por Megazyme (2020) indica que el método es específico para determinar amoniaco; dentro de la descripción del kit de reactivos ofrecido por esta compañía para dicha determinación, indican que el método presenta una respuesta lineal

para concentraciones de amoniacó desde 0,2 a 7 μg de amonio. “La prueba es específica para amoniacó y no muestra actividades secundarias ni interferencias con varios ácidos, azúcares o conservantes relevantes como el sulfito” (R-Biopharm Ag, 2020, p. 1). En acuerdo con lo mencionado anteriormente Suriñach (2017) indica de igual forma que el método presenta un comportamiento lineal hasta los 250 mg/L de nitrógeno amoniacal presentando un muy buen factor de regresión; para asegurar los resultados es conveniente considerar hacer diluciones de una muestra, a fin de que el contenido del analito se halle dentro del rango de medición del método; es por ello importante considerar estos aspectos cuando se trabaje con kit de reactivos ya que los valores pueden variar entre uno u otro.

Respecto a la robustez del método, también estudiado por Suriñach (2017) indica que aparentemente la decoloración podría tener un efecto positivo ya que al emplear carbón activo se estaría eliminando sustancias presentes en los vinos como los polifenoles, que enmascaran el centro activo de la enzima lo que a su vez afectaría la reacción enzimática; aunque para poder asegurar lo antes mencionado sería necesario ahondar los estudios.

Claramente los dos métodos descritos deben ejecutarse en conjunto para poder determinar el NFA ya que cada uno está determinando una de las fracciones del NFA asimilable (la fracción orgánica proveniente de α -aminoácidos y la fracción inorgánica proveniente de iones amonio).

Estos métodos combinados son alternativa frente a otros métodos existentes y que presentan la opción de asegurar la cuantificación de las dos fuentes de nitrógeno asimilables por la levadura. Muñoz y Tobeña (2013) en su estudio de comparación del método de formol con el OPA y enzimático indican: “el método espectrofotométrico no mide prolina y responde de una

manera homogénea a todos los aminoácidos” (p. 40). De igual forma aunque dejando observaciones sobre las variaciones que pueden presentarse en resultados al desarrollar el análisis en muestras diversas como por ejemplo soluciones estándar y las generadas en el proceso de elaboración de vino, como vinos finalizados, muestras de vino en proceso de fermentación y muestras muy coloreadas, Suriñach (2017) realiza observaciones que resultan útiles para el análisis del desempeño de los métodos: “en muestras acuosas de estándar (...) estudiando tres niveles de concentración (50,0, 125,0 y 250,0 mg/L) los parámetros de repetibilidad muestran un buen nivel de precisión”(p.23). Sobre muestras de vino analizadas se confirmó la veracidad del método en tres tipos de vino (blanco, tinto, rosado) con un incremento global en la desviación estándar, que podría estar asociado a la matriz ya que estos estándares no fueron preparados con material certificado; a su vez para establecer resultados en relación a la precisión se observa que el vino afecta negativamente a ambos parámetros (repetibilidad y reproducibilidad) observándose que frente a soluciones acuosas las desviaciones estándar de una muestra de vino son mayores; tanto en el método OPA como en el enzimático, esto aclarando que se trató de mediciones consecutivas a lo largo de varios días de las muestras de vino y las soluciones acuosas. Respecto a la robustez de los métodos frente a la dilución de una muestra estándar de vino, se estableció que la dilución no genera efecto significativo en ninguno de los métodos (Suriñach, 2017); sin embargo no se observó lo mismo en relación a los proceso de decoloración que en algunos casos requieren muestras de vino, respecto a estos resultados se habló anteriormente.

Aspectos de Seguridad y Salud

Respecto a las consideraciones de los reactivos empleados en el método OPA, y teniendo en cuenta que generalmente ya vienen preparados y envasados, es decir se trata de soluciones y mezclas con concentraciones específicas, se tiene las siguientes observaciones relevantes:

Las concentraciones de los reactivos podrían decirse que son bajas; aun así, es conveniente tener precaución:

- El reactivo denominado buffer y que se halla compuesto por sodio tetraborato decahidrato presenta un peligro para la reproducción, no se hallan otras observaciones respecto a esta solución.
- El o-ftaldialdehído, es nocivo en caso de ingestión y puede generar sensibilidad cutánea, adicional es considerado como peligroso agudo y crónico para el medio ambiente acuático, por lo tanto, su descarga en el medio ambiente debe ser totalmente evitada.
- La N-acetilcisteína (grado reactivo analítico) es considerada como tóxica en caso de ingestión, presentando indicación de atención en relación a su clasificación como irritante ocular.
- Respecto a la peligrosidad del estándar empleado, tener en cuenta que pueden ser usados uno u otro; la glicina no presenta información sobre peligrosidad al igual que la isoleucina.

Por su parte los reactivos empleados en el método enzimático en general no son considerados peligrosos, pero reactivos empleados como conservantes presentan observaciones sobre peligrosidad que deben ser analizadas:

- El azida de sodio es un compuesto mortal en caso de ingestión, toxicidad aguda cutánea y respiratoria; toxicidad específica en órganos tras constantes exposiciones y muy tóxico para los organismos acuáticos.
- El sulfato de Litio clasificado como nocivo en caso de ingestión, irritante ocular, toxicidad acuática aguda.

Método de Análisis HPLC

Este método de análisis denominado como HPLC, realmente está indicando la técnica de análisis empleada (HPLC), el nombre con que debemos identificarlo es *método de aminoácidos primarios por HPLC*; este método se describe por varios autores en diferentes investigaciones como un método alternativo para determinar NFA. HPLC puede emplearse para cuantificar los aminoácidos individuales y el amoniaco en una muestra de jugo de uva (Petrovic et al., 2019).

Técnica Analítica Empleada

La cromatografía descrita por si sola, es una técnica empleada para separar componentes o solutos de una mezcla; los componentes se separan físicamente distribuyéndose en dos fases, una de ellas es un lecho estacionario y la otra un fluido que pasa a lo largo del lecho. (Giddings y Keller; 2020; García y Bermejo; 2006). Las fases son denominadas fase móvil y fase estacionaria, la fase móvil se denomina así por tratarse de un fluido que se emplea para transportar la mezcla de componentes que se desean separar, la fase estacionaria se trata bien de un sólido, líquido retenido sobre un sólido o un gel, que será el soporte donde se separan los componentes de la mezcla. Para el método en estudio se empleará el acrónimo HPLC que

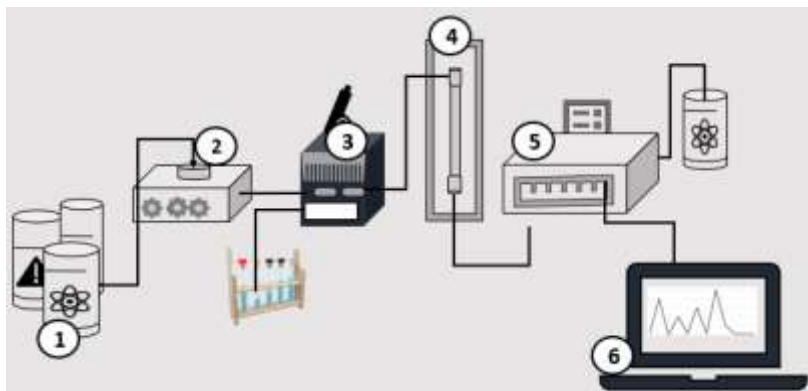
proviene de High Performance Liquid chromatography, para indicar que se trata de cromatografía líquida, donde la fase móvil empleada es un líquido en el que se disuelven iones o moléculas de muestra que luego pasan por una columna (fase estacionaria) para la separación.

Debido a que existen diferencias de intercambio iónico, adsorción, reparto o tamaño, diferentes solutos interactúan con la fase estacionaria en diferentes grados y por lo tanto se logra la separación de los compuestos; si para un soluto la distribución favorece al fluido las moléculas pasarán mayor parte del tiempo moviéndose con la fase móvil, mientras que otras moléculas serán retenidas por más tiempo por la fase estacionaria (Giddings y Keller, 2020; Linde, 2021).

Para el empleo de esta técnica, es necesario contar con el equipo llamado cromatógrafo, en general compuesto por: un sistema de inyección de la muestra, un sistema que permite que la fase móvil fluya durante el proceso de separación y a través de la fase estacionaria que normalmente es llamada columna, un sistema de detección, que se encarga de generar una señal la cual posteriormente es tratada y registrada (Ilustración 7). Claramente se requiere un sistema de conexiones tanto para el transporte de la fase móvil, como para el control de las diferentes partes del equipo y la captura de las señales generadas.

Ilustración 7.

Esquema de un sistema cromatográfico HPLC



Nota: 1 Solventes, 2 Bombas, 3 Sistema de Inyección, 4 Columna, 5 Detector, 6 Sistema de registro de datos.

La aplicación de un método de cromatografía líquida implica: contar con una muestra en solución que es inyectada sobre un flujo de fase móvil que es bombeada a través de todo el sistema; la muestra y la fase móvil fluye hacia la columna, en donde los componentes de la muestra interactúan con los compuestos de la columna y a su vez con la fase móvil generando la separación; al salir de la columna un detector identifica los compuestos de interés y registra las señales generando así un cromatograma, donde los picos que aparecen en función del tiempo de retención identifican a cada tipo de componente separado.

Principio del Método de Análisis

El método busca la separación de los α -aminoácidos presentes en la muestra, empleando una columna en fase reversa (RP), empleada para separación de aminoácidos; para lograr la

detección de los analitos la muestra es tratada con reactivos derivatizantes pre-columna; para la detección, es empleando un detector de fluorescencia.

Existen variedad de reactivos de derivatización, algunos autores describen el uso de cloruro de dansilo o etoximetilenmalonato de dietilo (DEEMM), o-ftaldialdehído, entre otros; de igual forma algunos autores describen el uso de un detector de arreglo de diodos (DAD) o un UV tradicional.

El principio de este método radica en la separación cromatográfica de los componentes de la muestra, para una posterior detección. La separación de una muestra en sus componentes radica en la interacción de estos con la fase móvil y la fase estacionaria; la separación se produce en la columna con intervención de la fase móvil. La muestra y la fase móvil son transportadas hacia la columna donde son forzadas a atravesarla, en este punto entran en juego los diferentes tipos de interacciones de los componentes de la muestra (analitos) con la fase estacionaria y la fase móvil, dado que por las características de cada analito pueden darse interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas que permiten una mayor o menor afinidad de los analitos con cada fase (Quattrocchi, Andrizzi y Laba; 1992); cuando un analito posee mayor afinidad por la fase estacionaria, este permanecerá más tiempo en ella reteniéndose allí y eluyendo más tarde que aquellos analitos con mayor afinidad por la fase móvil, que serán menos retenidos en la fase estacionaria y por ende eluirán antes.

De acuerdo a la naturaleza química de los componentes a separar, es seleccionado el tipo de columna y la fase móvil. La columna empleada en este método, podría decirse de uso general, se trata de una columna para fase reversa C18, formada por partículas de sílice totalmente

porosas, esféricas y uniformes unidas con un ligando grupo alcano C18 octadecilo; empacadas en un tubo de acero inoxidable; esta fase estacionaria es hidrofóbica lo cual permite una interacción con los solutos atrayéndolos o reteniéndolos débilmente (Sadjadi, 2019; Cejudo-Bastante et al., 2010). Teniendo en cuenta el tipo de columna y los componentes de la muestra a separar, para generar la elución de los analitos, típicamente se emplean mezclas acuosas de solventes orgánicos como acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros como fase móvil (eluyente). La elución puede llevarse a cabo empleando un solo solvente puro o con una mezcla de disolventes, cuya concentración puede ser constante o ajustada con variaciones de composición.

Los aminoácidos, que son los analitos de interés, y que se espera separar de una muestra, presentan amplia gama de polaridades; el índice de polaridad está relacionado con la fuerza de interacción de los solventes frente a solutos polares. En los aminoácidos no todos exhiben la misma propiedad; la polaridad de los aminoácidos está dada según la característica del radical, la cadena lateral (-R) puede ser diferente en tamaño, reactividad química, forma, o carga, lo que conlleva a que existan aminoácidos apolares, polares sin carga, polares con carga positiva o con carga negativa (Giraldo, Chamorro y Doria; 2010). Dada la polaridad de los analitos, los autores describen diferentes composiciones de fase móvil en el análisis de aminoácidos; ya que, su amplio rango de polaridad no permitiría resolverlos en un cromatograma por lo cual es necesario variar la composición de la fase móvil para mejorar el poder de elución; es común el empleo de mezclas de solventes aplicando la elución en gradiente que busca mejorar la separación de todos los componentes de una muestra; podría decirse que se juega con las interacciones de los componentes de la muestra con la fase estacionaria y la fase móvil.

En el caso de Kelly, Blaise y Larroque (2010) para el desarrollo del análisis de aminoácidos, describen el empleo de una columna C18, la fase móvil empleada es una mezcla binaria de Fase Móvil A y B, A consta de una solución de 95 % de acetato de sodio al 0.05M, pH 6,5 y 5 % de metanol; la fase móvil B consta de una mezcla metanol-acetonitrilo en proporciones 70-30; se desarrolló la elución empleando un gradiente con la fase móvil B, la cual al comienzo del análisis se halla en un 3% incrementándose a lo largo del tiempo hasta un máximo del 60% sobre los 32 minutos del análisis, para volver a un 3% de concentración a partir del minuto 35, para un total de corrida de 39 minutos. De igual forma en otro método descrito, se emplea una mezcla de solventes; fase móvil A 25mM de tampón de acetato a un pH de 5,65 y fase móvil B mezcla de acetonitrilo y metanol en proporción 80:20; para el análisis de aminoácidos, ion amonio e incluso aminos biogénicas; durante la corrida se aplica un gradiente con la fase móvil A con porcentajes desde 100% disminuyendo la proporción hasta un 20% mínimo y retomando sobre el minuto 70 al 100% (Cejudo-Bastante et al., 2010). Como se puede observar las proporciones de solventes pueden ser variables frente a análisis desarrollados en diferentes equipos, incluso estas pueden ajustarse según necesidad para asegurar la calidad de separación de los analitos.

Dadas las características de los aminoácidos estos deben derivatizarse para hacerlos visibles al detector y que este pueda ubicar los componentes de la muestra a la salida de la columna, ya que, aunque pudieran medirse directamente empleando detección UV o luz visible, la mayoría de los otros componentes de las muestras e incluso el solvente empleado en la fase móvil también absorben en la región del espectro que lo hacen los aminoácidos (entre 190 y 210 nm), por lo que generaran interferencia. (Callejón, Troncoso y Morales; 2010). La derivatización

puede hacerse antes de la columna (pre-columna) o después de la separación cromatográfica (pos-columna), raramente se encuentra derivatización en la columna.

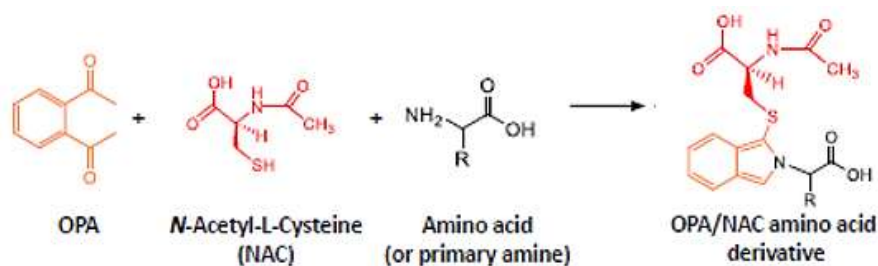
Como agentes derivatizantes se han empleado varios reactivos como la ninhidrina, el cloruro de dansilo, o-ftaldialdehído, isotiocianato de fenilo, cloroformiato de 9-fluorenilmetilo, entre otros. Los compuestos derivatizantes son sustancias químicas que generan un comportamiento específico para los grupos funcionales de interés, como lo son los aminoácidos y péptidos pequeños, y a través de su comportamiento es posible detectarlos con mayor especificidad e inequívocamente (Sgariglia, Soberón y Vattuone, 2010).

Es frecuente el empleo de OPA en la derivatización de los α -aminoácidos para la detección por fluorescencia; podría decirse que es el derivatizante más popular; sin embargo, sobre este se indica que los derivados formados no son muy estables, por ello OPA suele usarse combinado con otros reactivos. Es de anotar que OPA es considerado adecuado para derivatizar únicamente aminas primarias lo que se traduce en derivatizar únicamente aminoácidos libres, ya que él o-ftaldialdehído no reacciona con aminoácidos secundarios (Jajic, Krstovic, Glamocic, Jaksic y Abramovic, 2013; Gomis, Lobo, Alvarez y Alonso, 1990). OPA no posee una fluorescencia natural, pero se desarrolla al reaccionar con funciones amino primarias, la reacción tiene lugar en un medio acuoso fuertemente alcalino en presencia de un tiol (**Ilustración 8**), el más empleado es 2-mercaptoetanol (MCE) pero tioles voluminosos como N-acetilcisteína (NAC) o ácido 3-mercaptopropionico (MPA) generan derivados más estables. Los derivados resultantes pueden detectarse mediante UV a 330 nm pero para incrementar la sensibilidad a menudo es

elegida la detección por fluorescencia y la emisión se mide a longitudes de onda superiores a 430 nm (Callejón et al., 2010).

Ilustración 8.

Reacción de derivatización OPA/NAC empleada en análisis de aminoácidos



Nota. Adaptado de Methodologies for Analyzing Soluble Organic Compounds in Extraterrestrial

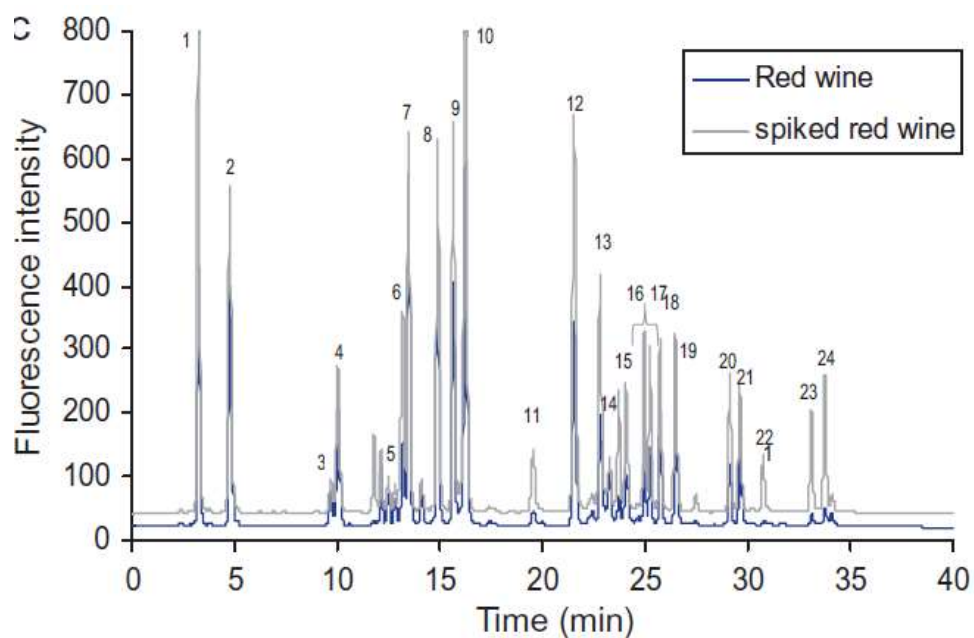
Samples: Amino Acids, Amines, Monocarboxylic Acids, Aldehydes, and Ketones (p.11) por

Simkus et al., 2019, *Life*.

Una vez separados y detectados los analitos de interés lo que se obtiene a partir del detector y el sistema de registro es el llamado cromatograma (Ilustración 9), que es una gráfica compuesta por una línea base y unos picos de área y alturas variables, en el eje Y se grafica la señal generada por el detector y en el eje X, se grafica el tiempo (en minutos) en el que aparece cada pico desde que fue inyectada la muestra; los picos en la gráfica corresponden a los componentes de la muestra separados y detectados. Como se observa en la ilustración 11, en una corrida cromatografía de aproximadamente 40 minutos son detectados 24 analitos lo cual se evidencia por la formación de los picos; la identificación de cada analito se realiza por el tiempo de retención al momento en que aparece la señal (pico) y que se compara con un patrón de composición conocida (Hernández, 2010).

Ilustración 9.

Cromatograma obtenido a partir de muestra de vino y vino enriquecido



Nota. Adaptado de Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey (p. 390) por Kelly et al.,2010, *Journal of Chromatography A*.

A partir de los datos del cromatograma (tiempos de retención, área, altura de los picos) se obtiene la información tanto de identificación como cuantificación del compuesto; en este caso, en el cromatograma expuesto por ejemplo se observan los picos 2, 7, 11 y 13 que corresponden a ácido glutámico, glicina, tirosina y valina, al igual que los picos 22 y 23 que corresponden a cadaverina e isoamilamina, analitos pertenecientes a aminoácidos y aminas biogénicas detectados en una muestra de vino.

Para la determinación de aminoácidos por HPLC el tratamiento de derivatización es indispensable; algunos equipos cuentan con un auto muestreador que realiza la adición automática de los derivatizantes extrayendo volúmenes de viales comunes y luego los extrae de un vial de muestra; esto permite que tanto las soluciones comunes como la muestra queden juntas en el bucle de la muestra antes de la inyección; a su vez se puede configurar un retraso en el tiempo de inyección útil para estos tipos de tratamientos (Waters, 1993). En caso de no contar con el sistema automático de inyección; la derivatización puede hacerse en el vial y una vez transcurre el tiempo que sea necesario se tomará la muestra y se inyectará en el cromatógrafo.

Haciendo la observación de que existen variaciones en el método para la determinación de α -aminoácidos por HPLC fase reversa, a continuación se describen en general los materiales y el método empleado por Kelly et al., (2010) método validado para determinación tanto de aminoácidos como de aminas biogénicas en uvas y vino por HPLC con derivatización pre-columna, con una mezcla binaria de solventes; para lo cual se emplearon en general los siguientes reactivos:

- Soluciones madre de aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, serina, valina, glutamina, treonina, glicina, lisina y otros) preparadas en HCl 0.1 M, 4g/L de cada analito.
- Solución de OPA disuelto en metanol (MeOH) 50 mg OPA en 10 mL MeOH
- Solución de N-acetil-l-cisteína (NAC) disuelta en tampón de borato 0,2 M pH 9,5
- Solución 95 % tampón acetato de sodio 0,05 M y metanol al 5% (Fase Móvil A)
- Solución metanol-acetonitrilo 70-30 (Fase Móvil B)

El detector empleado es de fluorescencia ajustado a longitudes de onda de excitación y emisión de 330 nm y 440 nm. La fase móvil fue programada en gradiente de tal forma que a comienzo de la corrida se halla un 3% de fase móvil B, incrementándose la proporción de B a lo largo del tiempo hasta un 60%, para retomar al final la reducción de B nuevamente a 3%. La derivatización se llevó a cabo automáticamente en el bucle de muestra, la mezcla de 2 μ L de OPA-NAC, 2 μ L de muestra, mezclar, tiempo de espera de 2 minutos, extraer 3 μ L de agua, mezclar e inyectar.

Características de Desempeño del Método

Los métodos cromatográficos son considerados como los mejores para conseguir la separación de componentes en muestras complejas. Estos tipos de métodos tienen una alta popularidad debido a que se considera que la técnica analítica es de alta sensibilidad; además que presentan fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y una gran idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.

En el desarrollo de un método cromatográfico se ajustan diferentes parámetros para asegurar la separación de los componentes de la muestra y su detección; Kelly et al., (2010) para desarrollar un método más simple y rápido, frente a su método de referencia, empleó una columna con un diámetro menor, a fin de reducir el caudal de fase móvil, el programa de gradiente de la fase móvil fue modificado a una mezcla binaria en relación al método de referencia que empleaba un gradiente ternario, estas modificaciones en general reducen el consumo de solventes y una elución completa de los analitos en menor tiempo. Además de ello, el empleo de determinados reactivos derivatizantes fue considerado apropiado para asegurar la

estabilidad de los compuestos formados y su posterior detección. El reactivo de derivatización empleado fue una mezcla de OPA/NAC 1:5; dado que por estudios anteriores se ha indicado que NAC forma compuestos de isoindol más estables con OPA; Callejón et al. (2010) indican que OPA genera derivados altamente fluorescentes, reacciona exclusivamente con α -aminoácidos y la derivatización toma apenas unos pocos minutos (1-2 min), sin embargo presenta desventaja por una baja respuesta con los aminoácidos Lisina y cisteína; sin embargo de acuerdo a Kelly et al. (2010) Lisina mostró un porcentaje de recuperación superior al 85% mientras que su CV% fue de 7 en la prueba de repetibilidad para el rango más bajo de concentración trabajado.

Los resultados de la validación desarrollada por Kelly et al., (2010), permitieron establecer que el método es apropiado para el análisis de 16 aminoácidos y 7 aminas biogénicas, con una precisión intermedia que varía desde 0,4% RSD en concentraciones de 10 mg/L hasta un 10% en concentraciones de 0,25 mg/L; observándose una particularidad con el aminoácido Serina el cual muestra valores de CV% más altos en todo el rango de concentraciones; de igual forma se determinó la recuperación, tanto en vino como jugo de uva, donde se observó que generalmente la recuperación fue superior al 80% y máximo 104%.

Cabe indicar que el método por HPLC para determinar α -aminoácidos se suele emplear como referencia en otros estudios; es el caso de Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia (2007) quienes emplearon el de análisis de HPLC con derivatización en línea acoplada con OPA y 2-mercaptoetanol (MCE) para análisis de aminoácidos primarios en una comparación con el método de formaldehído, el método OPA y el método de ninhidrina, donde se indica que no se hallan diferencias significativas entre los valores medidos por los métodos Ninhidrina, OPA y

HPLC; haciendo la observación que por HPLC no se detectó amonio. Respecto a esta última observación; Alonso, Gutierrez y Romero, (2007) en el desarrollo del método simultáneo para aminas biogénicas, aminoácidos e iones amonio, emplearon de igual forma derivatización pre-columna con etoximetilenmalonato de dietilo (DEEMM) y detector de matriz de fotodiodos monitoreando a 280, 269 y 300 nm; generando datos reproducibles de todos los analitos de interés; con una repetibilidad con coeficientes de variación menores al 5 %, recuperaciones entre 94 y 103% tanto en vino como en muestras de cerveza; cabe indicar que el método aplica tanto para aminoácidos primarios como secundarios. En otro estudio desarrollado por Callejón et al. (2008) en el que se determinan 22 aminoácidos y el ion amonio en muestras de vinagre, se empleó como derivatizante Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC), este derivatizante reacciona con aminoácidos primarios y secundarios generando compuestos fluorescentes estables; el estudio informa que existe una respuesta lineal del método frente a la concentración de cada estándar y la respuesta generada del detector; también describen una buena selectividad dado que la mayoría de los analitos detectados presentaron una resolución (R) aceptable entre picos adyacentes (R entre 1,1 y 1,5), la resolución mide la capacidad de la columna para separar los analitos. Algunas observaciones relevantes sobre este método indican que no es sensible para el aminoácido triptófano, además en la determinación de veracidad mediante la prueba de recuperación, en una muestra de vinagre se obtuvieron valores bajos de recuperación para los aminoácidos cisteína y serina (53,0% y 64,3%) con un promedio de recuperación para los demás aminoácidos de un 80% incluyendo el ion amonio (87%). Callejón et al. (2010) indican que el empleo de AQC tiene como desventaja que lisina y triptófano muestran menor fluorescencia y en el caso de presencia de amoniaco, si este no se deriva

completamente pueden generarse distorsiones por su exceso en el análisis de los aminoácidos arginina y treonina.

Como se observa estos estudios indican que se puede establecer un método en HPLC que permita determinar las dos fuentes de nitrógeno asimilables por la levadura (aminoácidos y amonio), asegurando que las características de desempeño sean apropiadas para todos los aminoácidos de interés.

Aspectos de Seguridad y Salud

Este método requiere reactivos de alta calidad; de hecho, para el uso en técnicas cromatográficas los reactivos están diseñados específicamente con el mayor grado de pureza y se clasifican como grado HPLC.

Las recomendaciones de seguridad respecto al uso de los reactivos van más direccionados a los reactivos derivatizantes y los solventes empleados en la fase móvil, ya que en general los aminoácidos empleados para validación o control del método no son considerados peligrosos. En el caso de los siguientes reactivos:

- OPA y NAC: OPA es considerado como tóxico, corrosivo con toxicidad específica de algunos órganos del sistema respiratorio tras exposición, de igual forma es considerado muy tóxico para el medio ambiente. NAC presenta clasificación como irritante ocular.
- 2-mercaptoetanol (MCE): es considerado altamente tóxico oral, por inhalación, cutáneo (mortal en contacto con la piel), es tóxico para la reproducción y genera

daño en determinados órganos por exposiciones repetidas, es tóxico para el medio ambiente por lo tanto debe ser evitada su liberación.

- Etoximetilenmalonato de dietilo (DEEMM): este reactivo es considerado altamente tóxico al igual que representa un peligro para el medio ambiente; nocivo en caso de ingestión e irritante cutáneo.
- Acetato de sodio y metanol para fase móvil: el acetato de sodio no presenta observaciones de seguridad que se consideren muy importantes, por su parte el metanol presenta una toxicidad aguda oral, cutánea y por inhalación, así como toxicidad específica en algunos órganos (lesión irreversible del nervio óptico).
- Acetonitrilo para fase móvil: el acetonitrilo es considerado tóxico, vía oral, cutánea, ocular y por inhalación.

Método de Análisis FT-IR

El método de análisis por espectroscopia IR es un método instrumental que consiste en el estudio de la interacción de la radiación con la materia, la fuente de radiación emite en el rango del espectro infrarrojo; que pasa a través de un interferómetro y de ahí a la muestra generando un interferograma, luego es registrado por un detector y finalmente se modifica la señal en una computadora donde se realiza la transformada de Fourier y se convierte en un espectro. FT-IR o FTIR se traduce como espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.

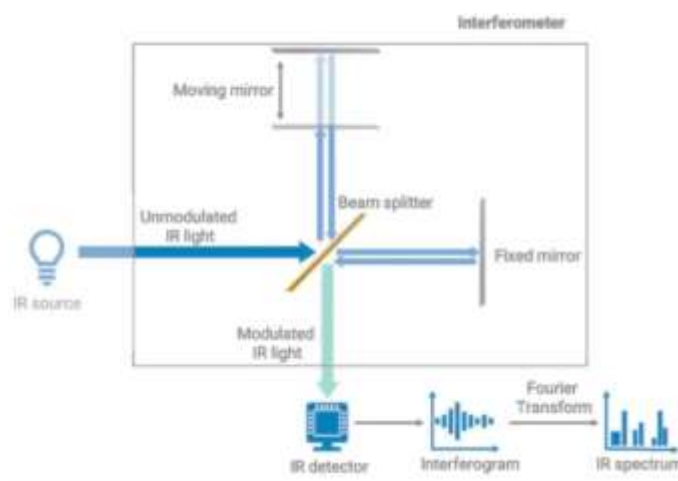
Técnica Analítica Empleada

La espectroscopia FTIR es un tipo específico de espectroscopia de infrarrojos que a diferencia de un espectrómetro IR dispersivo, el cual divide la luz entrante en sus componentes espectrales y los mide individualmente uno a la vez, mide simultáneamente todas las frecuencias de luz y el espectro IR es obtenido mediante una conversión matemática llamada transformada de Fourier (Agilent Technologies Inc., 2021). Para obtener el espectro IR se pasa radiación a través de una muestra, para determinar qué fracción de la radiación incidente es la que se absorbe en función de la longitud de onda; dicha radiación absorbida excita las moléculas generando que los enlaces químicos vibren de distintas manera (Materials Evaluation and Engineering, 2014; Ress, 2010). Cada grupo funcional de una molécula presenta vibraciones únicas que se reflejan en diferentes bandas del espectro IR, usando bandas individuales en el espectro IR se puede determinar que grupos funcionales están presentes en la muestra (Agilent Technologies Inc., 2021).

La espectrofotometría FTIR nació con la invención del interferómetro, con su desarrollo se reconoció que al calcular la transformada de Fourier (FT) del patrón de interferencia o interferograma, es posible obtener un espectro Ilustración 10.

Ilustración 10.

Representación esquemática de un interferómetro



Nota. Adaptado de *Conceptos básicos de la espectroscopia FTIR*, por Agilent Technologies, Inc., 2021, Agilent (<https://www.agilent.com/>)

El interferómetro (Ilustración 10) está constituido por una fuente de luz en el rango IR, un divisor de haz divide la luz IR incidente en dos, un haz de luz pasa por el divisor de haz y se refleja en un espejo estacionario que refleja la luz de regreso al divisor, la otra mitad de luz se refleja en un espejo móvil que a su vez refleja la luz de regreso al divisor, los espejos se hallan alineados de tal forma que los rayos reflejados se recombinan cuando se encuentran en el divisor de rayos (Thermo Nicolet Corporation, 2001; Subramanian y Rodríguez-Saona, 2009); el haz de luz recombinado pasa a través de la muestra y es detectado por el detector, la señal contiene información sobre cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda.

La señal que sale del interferómetro es denominada interferograma y es un gráfico donde la intensidad de luz es indicada en voltios sobre la diferencia de distancia recorrida por los dos haces de luz que se crea por el movimiento del espejo móvil (llamado retardo óptico o OPD); en

resumen el interferograma se forma de sumar un gran número de ondas sinusoidales de intensidad en diferentes longitudes de onda (Subramanian y Rodríguez-Saona, 2009); dado que este gráfico no se puede interpretar, se decodifica empleando para ello el análisis de Fourier.

La transformación de Fourier (FT) es un procedimiento matemático (...) descompone el interferograma (...) en ondas sinusoidales para cada longitud de onda de la luz. Estas ondas sinusoidales se disponen sobre la longitud de onda para producir el espectro convencional. (Subramanian y Rodríguez-Saona, 2009, p.155)

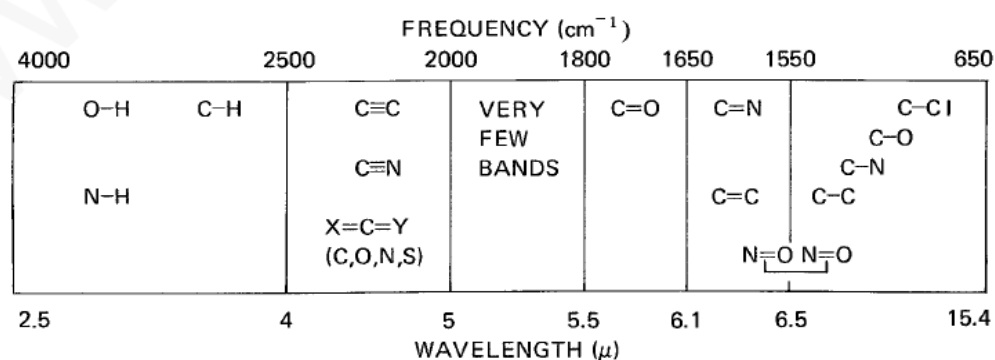
Para obtener el espectro de un compuesto primero se obtiene un interferograma del “fondo” que consiste en gases atmosféricos activos en el infrarrojo, se somete el interferograma a la transformada de Fourier que produce el espectro de fondo, luego se coloca la muestra a analizar y se obtiene el espectro resultante; este espectro contiene las bandas de absorción tanto del compuesto como del fondo, por lo cual el software de un computador sustrae automáticamente el espectro del fondo dejando así solo el espectro del compuesto que se está analizando (Pavia, Lampman, Kriz y Vyvyan; 2009).

Una vez generado el espectro de absorción IR para una muestra analizada, se puede determinar qué tipos de enlaces químicos están presentes en las moléculas que la conforman, puesto que cada tipo de enlace tiene una frecuencia de vibración distinta, absorbiendo radiación IR de diferentes longitudes de onda (Khan Academy, 2021).

Cada tipo de enlace regularmente absorbe sólo en ciertas porciones de la región infrarroja vibratoria, por lo tanto, se puede definir un rango de absorción para cada tipo de enlace (Ilustración 11).

Ilustración 11.

Regiones aproximadas de absorción de tipos comunes de enlaces



Nota. Adaptado de *Introduction to spectroscopy* (p.17), por Pavia et al., 2009, Editorial Brooks Cole CENGAGE Learning.

Principio del Método de Análisis

Para emplear este método FTIR, se requiere la construcción de una base de datos de modelos de calibración optimizados; realmente se trata de un método indirecto, ya que utiliza una calibración basada en resultados previamente determinados por otro u otros métodos, a partir de los cuales se establecen las comparaciones necesarias.

Para extraer el valor de la espectroscopia de infrarrojos (IR), es necesario configurar la calibración, la cual puede desarrollarse mediante técnicas de análisis de datos multivariantes,

también conocido como quimiometría, lo que permite extraer la información analítica que contienen los espectros y luego se correlaciona con las propiedades contenidas en el conjunto de datos de referencia (Petrovic, 2018).

Para establecer el método FTIR, primero se realiza el análisis de las muestras mediante el método o métodos de referencia; luego se presentan al equipo para adquirir el espectro IR para procesamiento estadístico, esta es la forma como se logra el banco de espectros. Luego, los espectros generados son confrontados con los valores del parámetro de interés obtenidos mediante el método de referencia, con el fin de seleccionar los anchos de banda mejor correlacionados con los valores del parámetro en estudio; a partir de estos datos se forma un modelo estadístico predictivo que relacionara el valor predictivo del parámetro con los valores de absorbancia de los anchos de banda seleccionados (Dubernet, Dubernet M.,Grasset y García; 2001). “Para la espectroscopia FT-IR, el uso de quimiometría es imperativo. De hecho, todos los instrumentos FT-IR vienen con un software integrado que se utiliza para la interpretación de espectros y para análisis estadísticos” (Basalekou, Pappas, Tarantilis y Kallithraka, 2020, p.6). Dada la naturaleza multivariante en los espectros IR es necesario contar con técnicas estadísticas que consideren más de una variable a la vez. Es allí donde las técnicas quimiométricas como la regresión de componentes principales (PCR) o la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), permiten considerar múltiples variables al igual que manejar datos que estén altamente correlacionados o ruidosos; abordando los problemas relacionados con el manejo de datos espectroscópicos (Petrovic, Aleixandre-Tudo y Buica; 2020).

El éxito de un método FTIR radica en las calibraciones, estas deben ser capaces de proporcionar resultados precisos para muestras cuya matriz es compleja y en cuya población de muestra se presentan variaciones naturales.

De acuerdo a Agudelo y Vásquez (2009) Las etapas que normalmente se desarrollan para construir un modelo de calibración son:

- Selección del conjunto de calibración (muestras) que represente toda la variabilidad existente y el intervalo del parámetro, para lograr buena capacidad de predicción del modelo tanto cualitativa como cuantitativa.
- Obtener la señal analítica es decir obtener el registro de los espectros en la región que se considere oportuna.
- Construir el modelo de calibración mediante las herramientas matemáticas sobre la señal analítica que permita establecer la relación entre esta y el parámetro que se desea determinar; establecer la relación, por ejemplo, entre el área de las bandas de absorción o la altura, con la propiedad o el parámetro a medir, en esta parte es donde se empleando por ejemplo la calibración univariante o multivariante.
- Una vez se crea el modelo de calibración se debe someter a evaluación por medio de muestras diferentes de las empleadas en el conjunto de calibración, de estas se debe conocer el parámetro que se pretende predecir, se comparan entonces los resultados con los valores conocidos.

Dubernet et al., (2001) describe el análisis de nitrógeno asimilable en mosto de uva por FTIR; partiendo como método de referencia los métodos conjuntos de OPA y Enzimático; 100 muestras de mosto de uva de diversas variedades fueron analizadas, primero se desarrollaron los análisis mediante los métodos de referencia y luego fueron determinados los espectros IR; a partir de los espectros son seleccionados los anchos de banda del espectro que mejor se correlacionan con los valores del parámetro (NFA). Luego se construye el modelo estadístico predictivo mediante el uso de PLS que relaciona directamente el valor predictivo del parámetro con los valores de absorbancia de los anchos de banda seleccionados; entonces las calibraciones obtenidas se validan.

En otros estudios se empleó de igual forma la correlación de valores de referencia con los espectros mediante el algoritmo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) mediante el empleo del software OPUS; evaluando la confiabilidad de los modelos de calibración y la precisión del método FT-NIR e incluso FT-MIR; partiendo de un conjunto de datos recolectados tras el análisis de 905 muestras de jugos de uva las cuales pertenecían a diferente añadas y orígenes a fin de que los datos para establecer la calibración del método sean suficientemente representativos de la población, como método de referencia fueron empleados el método OPA y enzimático; para la recolección de los espectros las muestras son sometidas a centrifugación para eliminar posibles partículas en suspensión (Petrovic et al., 2020).

Características de Desempeño del Método

Sobre el método, cabe indicar que el uso de IR por FT, ha sido investigado para análisis de NFA en diferentes rangos del espectro IR (MIR, NIR); ya que se considera que cada región proporciona ventajas únicas, frente a las otras; existiendo algunas diferencias en la calidad de los datos generados entre uno u otro, pero compartiendo el mismo principio.

El empleo de IR ha sido bien acogido dado que es considerado como sencillo, rápido, no destructivo entre otras características que lo hacen atractivo en la industria moderna, lo que ha generado un oleada de aplicaciones en el análisis cuantitativo; sin embargo, existe un aspecto crítico de la técnica relacionada con su precisión, lo cual es considerado como dependiente de la medida en que los volúmenes analíticos muestreados representen adecuadamente las muestras (Bauer et al., 2008).

En acuerdo con lo anterior expuesto, Skoutelas et al., (2011) indican: “La calibración y validación de la espectrometría FT-IR depende en gran medida de las condiciones del análisis, del procedimiento de muestreo y de la calidad de los datos de referencia” (p.265).

Las calibraciones que sean desarrolladas para implementar un método FTIR deben ser suficientemente sólidas para proporcionar resultados precisos en muestras que puedan generar grados de variación de forma natural, es decir, como en el caso de los mostos de uvas empleadas en la industria vinícola, las cuales pueden presentar variaciones significativas en su composición bien por el tipo de variedad de uva o las condiciones ambientales del cultivo del año de cosecha o incluso las condiciones del suelo; estos tipos de muestras que exhiben una complejidad natural

requieren conjuntos de calibración representativos para no ignorar el grado de variación presente de forma natural en la población (Petrovic et al., 2020).

Un aspecto que puede afectar el proceso de calibración de un método FTIR tiene que ver con la forma de probar los modelos estadísticos de calibración; el hecho de no probar los modelos empleando conjuntos de validación independientes. En relación con este tema emplear la denominada “validación cruzada” (CV), que se puede definir como una técnica de validación que implica dividir las muestras en subconjuntos que luego en la calibración se va eliminando un subconjunto diferente de los datos de calibración hasta que cada subconjunto se hayan omitido una vez, conducirá a resultados muy optimistas dado que las muestras empleadas para validar el modelo fueron las mismas que se emplearon para calibrar el modelo; esto puede llevar a que la capacidad predictiva del modelo sea menor (Petrovic, 2018).

Resulta indispensable garantizar que se recopile un gran número de muestras que representen adecuadamente las variaciones de la población; de igual forma que se lleven a cabo estrategias de validación adecuadas, a fin de que las predicciones en muestras futuras sean precisas partiendo de la evaluación de la capacidad predictiva de las calibraciones para cuantificación de NFA (Petrovic et al., 2019; Petrovic, 2018).

El proceso de evaluación del modelo de calibración empleado es sumamente relevante; los parámetros que se determinan permiten indicar si el modelo permitirá predecir las diferentes variaciones que se experimenten en una muestra. Es así que Petrovic, (2018) menciona parámetros como: Coeficiente de determinación para calibración (R^2_{CAL}) y coeficiente de

determinación para validación (R^2_{VAL}), error cuadrático medio de calibración (RMSEC), error cuadrático medio de predicción (RMSEP), RPD que trata de la relación entre la desviación estándar incorporada por conjunto de datos y el error estándar de rendimiento del modelo, entre otros parámetros que permiten evaluar el desempeño, precisión y confiabilidad de los modelos de calibración empleados. De acuerdo con Petrovic (2018) valores de R^2_{CAL} y R^2_{VAL} más cercanos a 1 indican que la variación observada es explicada totalmente; en ese orden el modelo puede explicar y contabilizar más variaciones. Por su parte el valor de RPD del modelo indicará la relación entre la desviación del conjunto de calibración o validación y el error de predicción; en ese orden cuanta más variabilidad tenga en cuenta el modelo y menor sea su error de predicción, el valor de RPD será mayor lo que indica que el modelo es más fiable; un RPD superior a 2,5 indica buen nivel de cuantificación, si alcanza un valor de 5 o más el modelo es viable para el control de calidad.

Dentro de un estudio desarrollado por Dubernet et al., (2001) para implementar FTIR en la cuantificación de nitrógeno asimilable, indican que empleando un gran número de muestras analizadas mediante OPA y enzimático como métodos de referencia, usando el modelo estadístico PLS para los espectros recopilados de diferentes muestras de mostos de uva (diferentes variedades, varios terruños), según sus criterios para juzgar la calidad de PLS resultó ser particularmente bueno, dado que la repetibilidad de FTIR resulta mejor que la de los métodos de referencia, lo cual consideran como dependiente de la estabilidad del instrumento. A su vez indican que la relación entre los métodos no presenta una diferencia significativa existiendo así una respuesta bien relacionada, permitiendo indicar que la medición de NFA en los mostos por el método FTIR, presenta un buen nivel de precisión comparable con los métodos de referencia,

que también son considerados de buena calidad y que ofrecen valores de referencia finos tal que se pueden optimizar los modelos estadísticos predictivo. En la prueba de repetibilidad la desviación estándar de los métodos de referencia fue de 6,9 mg/L Nitrógeno amoniacal frente a 5,1 mg/L Nitrógeno amoniacal del FTIR; por su parte lo correspondiente con el nitrógeno α -amino en mg/L la desviación estándar del método de referencia fue de 3,2 frente a una de 3,0 con FTIR (Dubernet et al., 2001).

En relación con los requerimientos que se establecen para el empleo del método, es de anotar que como tal no son necesarios reactivos para el desarrollo de un análisis; y en relación a la muestra puede ser presentada al equipo bastando con una centrifugación o filtración sencilla; realmente es nula la necesidad de preparación de reactivos o de la muestra. Es pertinente indicar que la técnica no presenta una naturaleza destructiva o que afecte la muestra de alguna manera y ofrece resultados con una rapidez que métodos químicos convencionales no igualan.

Los costos del empleo de la técnica estarán asociados con la adquisición del equipo y contar con personal capacitado para el montaje del método y ejecución de los análisis.

Aspectos de Seguridad y Salud

Partiendo del hecho que el método como tal no emplea reactivos, a excepción del montaje del método cuando se requiere el desarrollo de los análisis con los métodos de referencia, las consideraciones respecto a seguridad y salud de FTIR realmente no aplicaran.

Consideración de Costos

El costo que se genera para la ejecución de los métodos de análisis proviene de varias fuentes, una de ellas es la adquisición de equipos, a continuación, se registran datos aproximados sobre costo de los equipos estrictamente necesarios para la ejecución de los métodos en estudio.

Tabla 2.

Aproximación costos de equipos.

		Total
Método Formaldehído		
PHmetro	\$ 3.800.000,00	
Centrífuga	\$ 5.800.000,00	\$
Placa de agitación	\$ 1.400.000,00	11.000.000,00
Método Ninhidrina		
Espectrofotómetro UV-VIS	\$ 60.000.000,00	
Baño de calentamiento	\$ 3.400.000,00	\$
Centrífuga	\$ 5.800.000,00	69.200.000,00
Método OPA-Enzimático		
Espectrofotómetro UV-VIS	\$ 60.000.000,00	
Centrífuga	\$ 5.800.000,00	65.800.000,00
Método HPLC		
Cromatógrafo Líquido	\$ 133.000.000,00	
HPLC		\$
Centrífuga	\$ 5.800.000,00	138.800.000,00
Método FTIR		
Equipo FTIR	\$ 237.000.000,00	
Centrífuga	\$ 5.800.000,00	242.800.000,00

Cabe indicar que, para el correcto desempeño de los equipos de laboratorio, estos requieren comprobaciones, mantenimientos o calibraciones que deben ejecutarse con frecuencia; estos procesos también acarrear un costo, sin embargo, son la forma de garantizar un buen funcionamiento del equipo y a su vez garantizar los resultados de los análisis en los cuales son empleados.

Asociado a los equipos también son necesarios reactivos y consumibles para la implementación del método, con excepción del método FTIR el cual que no requiere reactivos; los demás métodos emplean cantidades variables de reactivos puros o en solución cuyo consumo suma a los costos del método.

Calidad en Métodos Analíticos y Matriz Comparativa

Dado que la determinación de NFA se desarrolla para determinar un valor que se tendrá en cuenta para la toma de decisiones sobre un proceso productivo, se espera contar con un método que brinde resultados confiables; de ahí la necesidad de contar con información en relación a la calidad del método empleado a fin de asegurar que el mismo tiene capacidad para cumplir el uso previsto y que responde de acuerdo a las necesidades del proceso. Existiendo una amplia variedad de técnicas empleadas en diferentes métodos destinados a cuantificar NFA, es preciso configurar la mayor cantidad de información relacionada a la calidad de cada método en una matriz que permita analizar y evaluar la conveniencia de aplicar uno u otro. En este capítulo se definen algunos parámetros que están relacionados con la calidad de un método analítico y se construye la matriz comparativa registrando datos sobre dichos parámetros, incluyéndose aspectos que también resultan útiles y que pueden ser determinantes a considerar en la selección entre uno u otro método.

Contenido:

Calidad en métodos analíticos

Matriz comparativa métodos de análisis

Calidad en Métodos Analíticos

Cuando se aplica la determinación de un parámetro analítico, se busca generar un resultado sobre el cual no existan dudas para que el desarrollo del método genere resultados válidos; si el resultado de una prueba no es confiable entonces generará desconfianza en tomas de decisión que se requieran frente al producto o proceso sobre el cual fue aplicado el método de análisis.

Respecto a lo anterior un laboratorio donde se ejecute un procedimiento de medición requiere contar con procedimientos apropiados (ISO/IEC 17025, 2017). Dado que existen diversos métodos, es necesario comprender que algunos deben desarrollarse de acuerdo a normas que exigen entidades gubernamentales u organizaciones y otros pueden ser seleccionados a decisión del interesado; aun así, estos deben ser métodos que garanticen ser aptos para su uso previsto, lo cual implica que se consideraron algunas características de desempeño que fueron evaluadas para poder indicar que determinado método es apto para medir o determinar cierto parámetro o característica. Conjugando lo anterior ISO/IEC 17025 (2017) indica:

Las características de desempeño de los métodos validados tal como fueron evaluadas para su uso previsto, deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y deben ser coherentes con los requisitos especificados. (...) Las características de desempeño pueden incluir, pero no se limitan a, el rango de medición, la exactitud, la incertidumbre de medición de los resultados, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad del método, la linealidad, la repetibilidad o la reproducibilidad, la robustez

ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo y el sesgo. (p.13)

Dentro de ese marco, la construcción de la matriz comparativa está orientada a mostrar aspectos de cada método, características de desempeño registradas por los autores, que permitan confrontar las capacidades y limitaciones de cada método. Se registran parámetros como:

- **Precisión:** descrita por el Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales y términos asociados (VIM) (2012) como la proximidad entre un valor medido que se obtiene en mediciones repetidas de un mismo objeto o similares bajo ciertas condiciones especificadas que pueden ser condiciones de repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.
- **Repetibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, donde los resultados de análisis se obtienen con el mismo procedimiento de medida en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo; expresara la diferencia que pueda generarse entre los resultados o pruebas obtenidos de esta forma y se calcula como desviación estándar de los resultados (VIM, 2012; ASTM International, 2014).
- **Reproducibilidad:** es la precisión de medida bajo condiciones de reproducibilidad donde los resultados de análisis son desarrollados bajo el mismo método, en ítem idénticos, pero en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros, que reporta la diferencia que puede generarse entre los resultados obtenidos bajo dichas condiciones; se

reportan datos de desviación estándar y el coeficiente de variación (CV%) (Instituto de Salud Pública Chile, 2010; ASTM International, 2014).

- Coeficiente de variación: (CV) Instituto de Salud Pública Chile (2010) describe que corresponde a la desviación estándar dividida en la media; también se expresa como desviación estándar relativa (RSD), para expresarse en porcentaje el coeficiente de variación es multiplicado por 100:

$$\%CV = \frac{S}{X} * 100$$

Ecuación 9. Coeficiente de Variación %.

S= desviación estándar de las lecturas

X= promedio de la todas las lecturas

- Selectividad: “es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés” (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p.27).
- Especificidad: Es la capacidad de un método para medir sólo lo que se intenta cuantificar, el analito de interés y no otro u otros.
- Límite de detección: su abreviatura suele ser LOD; “valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia” (VIM, 2012, p.48) donde β y α iguales a 0,05.

- Límite de cuantificación: o LOQ; la cantidad más pequeña de un analito que puede cuantificarse confiablemente en una muestra.
- Intervalo de medida: también llamado rango de medida, indica el conjunto de valores que un instrumento, sistema de medida, método puede medir en determinadas condiciones.
- Veracidad: esto indica el grado de concordancia entre un valor medido y su valor de referencia aceptado, esta puede ser determinada mediante el sesgo o la recuperación.
- Recuperación: Se expresa como un porcentaje que permite ver el rendimiento de un método para extraer la cantidad de analito presente de forma natural en la muestra y el añadido en la fortificación. Se analizan muestras fortificadas y sin fortificar.

Matriz Comparativa de los Métodos de Análisis

El diseño de esta matriz permite el acceso en conjunto de la información recolectada y que informa sobre las características de desempeño que han sido establecidas en estudios previos, así como otros aspectos considerados relevantes. El interés de su construcción está centrado en la comparación de los diferentes parámetros relacionados con la calidad del desempeño de cada método, fruto de validaciones, verificaciones y comparaciones desarrollados por los autores de las diferentes fuentes investigadas.

Cabe indicar que los datos recolectados corresponden a investigaciones desarrolladas en diferentes años a lo largo del siglo XXI con documentos que datan desde 2001 hasta documentos de 2020, no obstante, inclinados por aquellas investigaciones más recientes; se realizaron dos excepciones con investigaciones desarrolladas en las últimas décadas del siglo XX, dada la importancia y relevancia de la información allí consignada. Adicional es importante mencionar que no todas las investigaciones o documentos en estudio reportan todas las características de los parámetros que se consideraron recolectar.

Tabla 3A
Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio

<i>Características</i>	<i>Método de Formol</i>	<i>Método Conjunto</i>				
		<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	<i>Método FTIR</i>
<i>Técnica analítica empleada</i>	Potenciometría y Volumetría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Cromatografía	Espectroscopia Infrarrojo
<i>Requerimientos para implementación²</i>	<ul style="list-style-type: none"> •pHmetro •Cabina de Extracción •Centrífuga •Balanza •Reactivos 	<ul style="list-style-type: none"> •Espectrofotómetro •Balanza •Baño de calentamiento •Centrífuga •Reactivos 	<ul style="list-style-type: none"> •Espectrofotómetro •Balanza •Baño de calentamiento •Centrífuga •Reactivos 	<ul style="list-style-type: none"> •Espectrofotómetro •Balanza •Centrífuga •Reactivos 	<ul style="list-style-type: none"> •Cromatógrafo líquido equipado³ •Balanza •Centrífuga •Reactivos 	<ul style="list-style-type: none"> •Espectrofotómetro Infrarrojo con transformada de Fourier •Computador y software necesarios •Centrífuga
<i>Uso de reactivos y su peligrosidad⁴</i>	H330 Mortal en caso de inhalación, H350 Puede provocar cáncer, H370 Provoca daños en los órganos, H341 se sospecha provoca defectos genéticos.	H372, provoca daño en órganos tras exposición repetida por vía oral. H302 nocivo en caso de ingestión. H315 provoca irritación cutánea.	H400 Muy tóxico para los organismos acuáticos, H360FD Puede perjudicar a la fertilidad, puede dañar al feto H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.	La peligrosidad radica en algunos conservantes empleados en las soluciones: H373 Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones repetidas. H310 Toxicidad aguda cutánea H400 Muy tóxico para los organismos acuáticos	H331 Tóxico en caso de inhalación. H361d tóxico para la reproducción H311 Toxicidad alta por contacto con la piel H302 nocivo en caso de ingestión H410 Muy tóxico para organismos acuáticos, efectos nocivos duraderos	Los requeridos para el o los métodos de referencia empleados.
<i>Alcance del Método (Analitos que determina)</i>	Amonio + Grupos Amino (aminoácidos)	Aminoácidos, amoniaco, grupos terminales α - amino de péptidos y proteínas	Aminoácidos (grupos α - amino nitrógeno de péptidos y proteínas)	Ion amonio NH_4^+	α -Aminoácidos	Ion amonio NH_4^+ α -Aminoácidos

²Se entiende que lo correspondiente a vidriería existe en todo laboratorio fisicoquímico.

³ Se entiende que el equipo se halla completamente equipado con sistemas de inyección, horno para la columna, detector, equipo de cómputo y software requeridos para la adquisición y procesamiento de la información.

⁴ Se colocan las frases H más relevantes, para profundizar es necesario ver MSDS de cada reactivo.

Tabla 3B*Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio*

<i>Características</i>	<i>Método de Formol</i>	<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método Conjunto</i>			
			<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	<i>Método FTIR</i>
<i>Selectividad y Especificidad</i>	Subestima el contenido de arginina y determina parcialmente Prolina ⁵ aprox. un 16,9 % de recuperación (Gump et al., 2002). La presencia de SO ₂ en la muestra genera interferencia (Hidalgo, 2018).	Reacciona con ácido γ -amino butírico, se estima parcialmente la prolina (EBC Analytica, 2015)	Iones de amonio aumentan la absorbancia, por tanto, se debe permitir que los ensayos reaccionen durante mínimo 15 minutos antes de las lecturas de absorbancia (Megazyme, 2012), Se reporta una recuperación de iones amonio aprox. 3,5 %. No reacciona con Prolina (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007).	“Las macromoléculas como los polifenoles (responsables del color del vino) presentes en el vino podrían enmascarar el centro activo de la enzima” (Suriñach, 2017, p.28). “No muestra actividades secundarias ni interferencias con varios ácidos, azúcares o conservantes relevantes como el sulfito (R-Biopharm Ag, 2020,p.1).	OPA ⁶ en presencia de un tiol reacciona con aminoácidos primarios, no reacciona con secundarios; y OPA/NAC genera derivados más estables (Kelly et al., 2010; Gomis et al., 1990)	El contenido de CO ₂ puede interferir porque el enlace C=O puede absorber en las bandas de otros parámetros (Correia, 2011), se recomienda desgasificar las muestras. Posible interferencia por coincidencia de bandas de absorción de la molécula de agua con las cadenas laterales de aminoácidos; además el azúcar y el agua se pueden superponer con los grupos NH ₂ ; esto en el caso de usar FTIR en modo absorción, ya que en modo transmisión los modelos fueron adecuados para la cuantificación de NFA (Petrovic, 2018).
<i>Límite de detección</i>	8,5 mgN/L Nitrógeno (Filipe Ribeiro y Mendes Faia, 2007)	18,1 mgN/L (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007)	2,59 mg/L Nitrógeno (Megazyme, 2012). Difiere con Suriñach (2017) 5mg/L Amino nitrógeno Libre.	19 mg/L (Suriñach, 2017). 0,7 mg/L (R-Biopharm Ag, 2020)	No se registra información en la literatura.	No se registra información en la literatura.

⁵ La prolina no es metabolizada por la levadura , por tanto, su cuantificación dentro de un método de análisis se subestima la concentración de NFA en una muestra.

⁶ En relación al reactivo derivatizante que generará la formación del isoindol que luego es detectado con un detector de fluorescencia.

Tabla 3C

Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio

<i>Características</i>	<i>Método Conjunto</i>					
	<i>Método de Formol</i>	<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	<i>Método FTIR</i>
<i>Límite de Cuantificación</i>	No se registra información en la literatura.	No se registra información en la literatura.	6 mg/L Amino nitrógeno libre (Suriñach, 2017).	23 mg/L Amoniaco (Suriñach, 2017) 1,2 mg/L amoniaco (R-Biopharm Ag, 2020).	Desde 0,05 mg/L, 0,1 mg/L y 0,25mg/L de acuerdo al rendimiento de los diferentes aminoácidos. (Kelly et al., 2010).	Error estándar de predicción SEP= 5,9mg/L (Skoutelas et al., 2011)
<i>Linealidad de Trabajo</i>	Se observa respuesta lineal, dado que a mayor concentración de analito mayor consumo de reactivo titulante.	Se observa un incremento lineal de desarrollo del color vs concentración creciente de nitrógeno empleando glicina como estándar (Spedding, 2013).	Se observó respuesta lineal para rango de 20 a 200 mg/L Amino Nitrógeno Libre (Otama et al., 2015); concuerda con Suriñach (2017) rango lineal 0-250 mg/l R^2 0,9996.	Desde 0-250 mg/L Amoniaco (Suriñach, 2017). R-Biopharm Ag, (2020) describe su kit lineal hasta 100 mg/L de amoniaco ideal muestras desde 5 hasta 95 mg/L.	Se confirmó linealidad del método en el rango de trabajo.	La curva de calibración mostró buen desempeño con un coeficiente de correlación de $R^2=0,993$ (Skoutelas et al., 2011).

Tabla 3D*Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio*

<i>Características</i>	<i>Método Conjunto</i>					
	<i>Método de Formol</i>	<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	<i>Método FTIR</i>
<i>Intervalo de Trabajo</i>	7,8 - 324 mg/L Nitrógeno (Skoutelas et al, 2011)	0-400 mg/L Amino Nitrógeno Libre (Merck KGaA, 2020)	0-250 mg/L Amino Nitrógeno Libre (Suriñach, 2017)	Desde 0-250 mg/L Amoniaco (Suriñach, 2017).	0,25 mg/L – 10 mg/L (Kelly et al., 2010).	80 - 300 mg/L YAN (Skoutelas et al., 2011) RPD 7,8 (RPD=desviación estándar de los datos SD/error estándar de predicción SEP). Con SD de 6,4 y un error de estándar de predicción SEP de 5,9 mg/L (3,8%) (Skoutelas et al., 2011). De acuerdo a Petrovic et al.,(2020) FT-IR en modo transmisión produjo modelos adecuados para cuantificar el NFA ya que RPDVAL estaba por encima de 3.
<i>Precisión en condiciones de Repetibilidad</i>	Desviación estándar 4,5 a 7,9 mgN/L; 1,6 a 2,6 % CV% (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007)	Desviación estándar ± 5 mgN/L, CV% de 2,2 a 2,9 % (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007).	%CV de 2% para concentraciones de 50 mg/L y 1 % CV para concentraciones de 250 mg/L con desviaciones estándar menores de 2,0 mg/L (Suriñach, 2017)	%CV de 1 y 2% para concentraciones en el rango 50 a 250 mg/L, con desviación estándar máxima de 2,4 mg/L. (Suriñach, 2017)	CV% promedio entre los rangos de concentración menor de 3%; sin embargo se observa %CV desde 8,63 en concentraciones de 0,25mg/L, reduciéndose a medida que se incrementa la concentración hasta %CV de 0,3 y menores, en concentraciones de 10mg/L (Kelly et al., 2010).	En prueba de repetibilidad entre método de referencia y método FTIR, se obtuvieron desviación estándar de 5,1 mg/L de Nitrógeno Amoniacal y una desviación de 3 mg/L de α -amino nitrógeno (Dubernet et al., 2001).

Tabla 3E*Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio*

<i>Características</i>	<i>Método de Formol</i>	<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método Conjunto</i>			<i>Método FTIR</i>
			<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	
<i>Precisión en condiciones de Reproducibilidad</i>	Desviación estándar 1,7 a 5,9 mgN/L; CV% 1,7% a 5,4 % (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007)	CV % 5 y 6; desviación estándar $\pm 3,5 - \pm 5,6$ mg/L FAN (Lie, 1973)	CV% de 0,7 a 1,2 para concentraciones entre los 50 y 250 mg/L Amino nitrógeno libre (Suriñach, 2017).	CV% de 1,5 a 2,7 con desviaciones estándar de 1,3 – 4,0 mg/L (Suriñach, 2017)	CV% promedio en el rango de medición menor de 7%, sin embargo se observan CV% desde 10% en concentraciones de 0,25 mg/l con desviación estándar de 0,036 y CV% inferiores a 0,8 en concentraciones de 10mg/L (Kelly et al., 2010)	No se registra información en la literatura.
<i>Recuperación</i>	Para Amonio 81,54 % con desviación estándar de $\pm 3,31$ y 91,27% $\pm 0,95$ para aminoácidos (Skoutelas et al., 2011).	Para Amonio: 30,3% desviación estándar $\pm 2,0$. Para aminoácidos 90,0% con desviación estándar de $\pm 5,8$ (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007).	Para solución de aminoácidos una recuperación de 102 % $\pm 5,1$ (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007).	No se registra información en la literatura.	Fue generalmente superior a 80 % en matrices de jugo de uva y vinos; algunos valores máximos de 104% (ácido glutámico) (Kelly et al., 2010).	No se registra información en la literatura.

Tabla 3F

Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio

<i>Características</i>	<i>Método Conjunto</i>					
	<i>Método de Formol</i>	<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	<i>Método FTIR</i>
Robustez	Capacidad para no verse afectado por variaciones pequeñas y deliberadas de pH. Insensibilidad a variaciones operativas comunes (como retraso en titulación).	Efectos del pH y el tampón afectan la sensibilidad del ensayo, de igual forma el tiempo de reacción para el desarrollo del color (Spedding, 2013).	La dilución de la matriz no tiene efectos significativo en el método; sin embargo en ensayos preliminares la decoloración requerida en las muestras tiene un efecto de reducir la medición del parámetro (Suriñach, 2017).	La dilución de la matriz no tiene efecto significativo en el método; la decoloración aparentemente tiene efecto en la reacción enzimática; lo que deberá profundizarse (Suriñach, 2017) “Los vinos tintos sin diluir o las muestras de zumo sin diluir muy coloreadas requieren decoloración”(Vintessential Laboratories, 2017, p.2).	No se registra información en la literatura.	La calidad de los resultados depende de la calidad de la calibración. Petrovic et al., (2020) describe para cuantificar NFA en mostos de una nueva cosecha (diferente de las muestras empleadas en la calibración) FT-IR demostró ser viable, al contar con un modelo de calibración robusto. Además, la predicción de variedades de tintas ⁷ a partir de blancas produjo buenos resultados con RPDVAL de 3, 7, 3,24 y 4,33 para YAN, FAN y Amoniaco.
Tiempo estimado para el análisis⁸	20 - 30 minutos aproximadamente	Mínimo 38 minutos (36 min tiempo de reacción y enfriamiento).	Aproximadamente 20 minutos	15 minutos aproximadamente	Incluido el reequilibrio de la columna, el análisis no supera los 40 minutos, sin considerar el tratamiento de la muestra.	2 minutos aproximadamente, con preparación mínima de la muestra (Skoutelas et al., 2011).

⁷ Relacionado a uvas de color oscuro o colores claros (ejemplo uvas rojas y verdes)

⁸ El tiempo indicado es una aproximación; no incluye tratamientos previos que deban realizarse sobre la muestra (diferentes a la centrifugación o dilución).

Tabla 3G*Matriz Comparativa de los Métodos Analíticos de Estudio*

<i>Características</i>	<i>Método Conjunto</i>					
	<i>Método de Formol</i>	<i>Método de Ninhidrina</i>	<i>Método OPA</i>	<i>Método Enzimático</i>	<i>Método HPLC</i>	<i>Método FTIR</i>
<i>Otras consideraciones</i>	Inversión inicial y mantenimiento relativamente bajos.	Ninguna	Para expresar el valor de NFA será necesario sumar los resultados de ambos métodos. En muestras que excedan el rango de concentración de trabajo de los métodos, se recomienda realizar diluciones.	Se empleó regresión lineal de mínimos cuadrados no ponderados en la curva de calibración; la pendiente e intercepto de los gráficos mediante regresión lineal de las áreas de los picos frente a la gráfica de concentración; para calcular las concentraciones encontradas se interpolan las áreas de picos individuales en los gráficos de calibración (Kelly et al., 2010) En un método cromatográfico los picos generados en el cromatograma se identifican comparando los tiempos de retención relativos de cada uno con los de los aminoácidos de referencia (Gomis et al., 1990).	Se empleó regresión lineal de mínimos cuadrados no ponderados en la curva de calibración; la pendiente e intercepto de los gráficos mediante regresión lineal de las áreas de los picos frente a la gráfica de concentración; para calcular las concentraciones encontradas se interpolan las áreas de picos individuales en los gráficos de calibración (Kelly et al., 2010) En un método cromatográfico los picos generados en el cromatograma se identifican comparando los tiempos de retención relativos de cada uno con los de los aminoácidos de referencia (Gomis et al., 1990).	FT-IR necesita un control sistemático con calibraciones regulares. Tiene un costo alto de inversión inicial. La calidad de las predicciones es dependiente del modelo de calibración empleado, de la cantidad y calidad de datos. ⁹

⁹ Este tipo de método se basa en un modelo de calibración creado a partir de datos reportados mediante empleo de otro método; la literatura analizada de FTIR no reporta los mismos parámetros estadísticos que puedan compararse frente a los registrados en los otros métodos de estudio.

Dada la información obtenida sobre los métodos, se pueden hacer dos grandes observaciones:

Dentro de las características se observa que todos los métodos presentan interferentes que pueden afectar la calidad de los resultados; estos interferentes están asociados a la propiedad específica que se cuantifica; es el caso del método de formaldehído donde la interferencia por la presencia de SO_2 afectaría sobre el volumen consumido de titulante, lo cual es el fundamento de la titulación; de igual forma sobre los métodos espectrofotométricos su interferente afectaría la intensidad de la luz que es detectada luego de atravesar la muestra. Todos los métodos exhiben uno o varios posibles interferentes que en general pueden ser tratados y eliminados, sin embargo, no es lo que ocurre con la presencia de Prolina en las muestras que se analizan mediante método de formaldehído o método de ninhidrina, sobre este interferente no se indica una forma de tratamiento o ajuste dentro de los métodos; esta interferencia generara una sobreestimación del contenido del NFA disponible para las levaduras.

De igual forma un aspecto positivo asociado a todos los métodos en estudio es su capacidad de generar una respuesta instrumental lineal en función de la concentración del analito; esto permite indicar a su vez el rango de respuesta o trabajo de los métodos; para el método de HPLC este rango fue sustancialmente diferente frente a los otros métodos, por ejemplo, el método de Formol presenta un rango de trabajo entre 7,8 -324 mg/l N frente a 0,25-10 mg/L N del método HPLC; en general esto implica que la muestra deba diluirse en mayor proporción para que la respuesta se halle dentro del rango, aspecto que igualmente presentan otros de los métodos (ninhidrina, OPA-Enzimático).

Por otra parte en relación con las características cualitativas de los métodos, conviene indicar que el método de FTIR es entre los 5 el que presenta una menor necesidad de equipos o reactivos; solo es necesario contar con un espectrofotómetro apropiado (FTIR) para desarrollar el análisis de NFA, no requerir reactivos y materiales, además de la pequeña cantidad de muestra para el análisis, es también un aspecto positivo dado que no será necesario lidiar con disposición de residuos o manipulación de productos químicos.

Metodología de Ejecución Analítica

En este capítulo se realiza una construcción gráfica donde se va indicando de manera progresiva cómo se ejecuta cada método de análisis, para ello, se diseñaron diagramas de flujo que permiten visualizar una a una las acciones que deben efectuarse para la determinación analítica en una muestra hasta la obtención del resultado. Se obtuvieron diagramas cuya visualización es fácil y accesible dado que informan brevemente sobre la acción específica que debe desarrollarse, en consecuencia, permite asimilar rápidamente la información de una acción y los pasos a seguir.

Contenido:

Diagrama para la ejecución del método de análisis de formaldehído

Diagrama para la ejecución del método de análisis de Ninhidrina

Diagrama para la ejecución del método de análisis OPA - Enzimático

Diagrama para la ejecución del método de análisis de HPLC

Diagrama para la ejecución del método de análisis de FT-IR

Diagrama para la Ejecución del Método de Análisis de Formaldehído

Para desarrollar el procedimiento se debe contar con los siguientes reactivos y la muestra a analizar, así:

- Reactivos: hidróxido de sodio 0,1N y 1 N, formaldehído 37%, peróxido de hidrógeno 33%
- Muestra: debe estar libre de partículas en suspensión y CO₂, para lo cual se recomienda la centrifugación y/o filtración.

Este diagrama se diseña de acuerdo a la metodología analítica descrita por Assis da Veiga (2014) y Muñoz y Tobeña (2013), en donde se puede visualizar cada una de las acciones concretas que permitan obtener la cuantificación de NFA en una muestra.

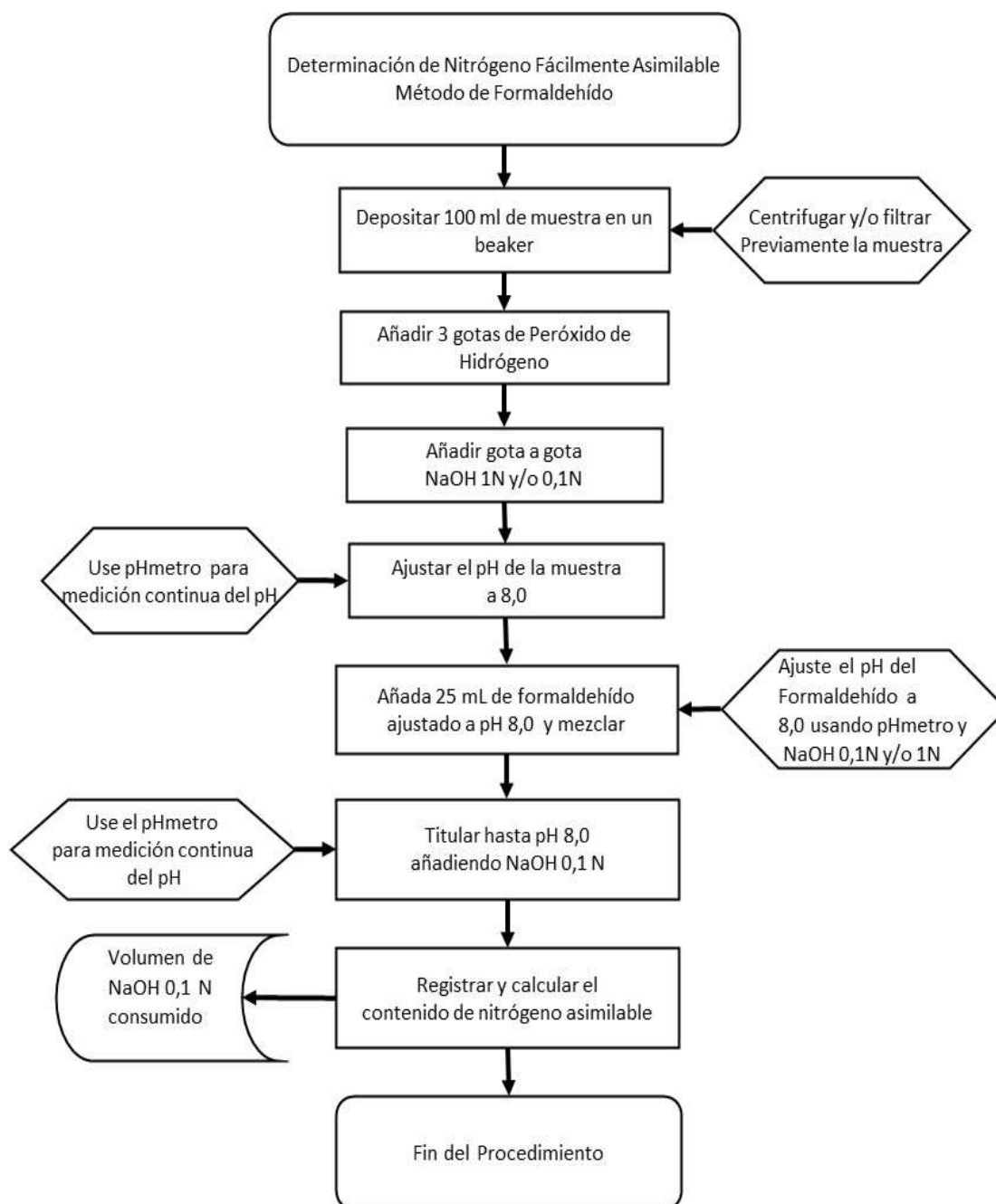
Ilustración 12.*Diagrama de flujo método de formaldehído*

Diagrama para la Ejecución del Método de Análisis de Ninhidrina

Para desarrollar el procedimiento se debe contar con los siguientes reactivos y la muestra a analizar, así:

- Reactivos: reactivo de color ninhidrina, solución de dilución, solución estándar de glicina (2mg/L de amino nitrógeno), agua destilada. Los reactivos deben ser de calidad analítica.
- Muestra: debe hallarse diluida, para lo cual se debe tomar 1 mL de muestra previamente centrifugada y/o filtrada y mezclar con 49 ml de agua destilada. La centrifugación y/o filtración se recomiendan para eliminar partículas en suspensión y CO₂.

Este diagrama se diseñó de acuerdo a la metodología analítica descrita por EBC Analytica (2015); en donde se evidencia cada acción en forma concreta y de fácil comprensión, a fin de facilitar el desarrollo lógico del procedimiento.

Ilustración 13.

Diagrama de flujo método de ninhidrina

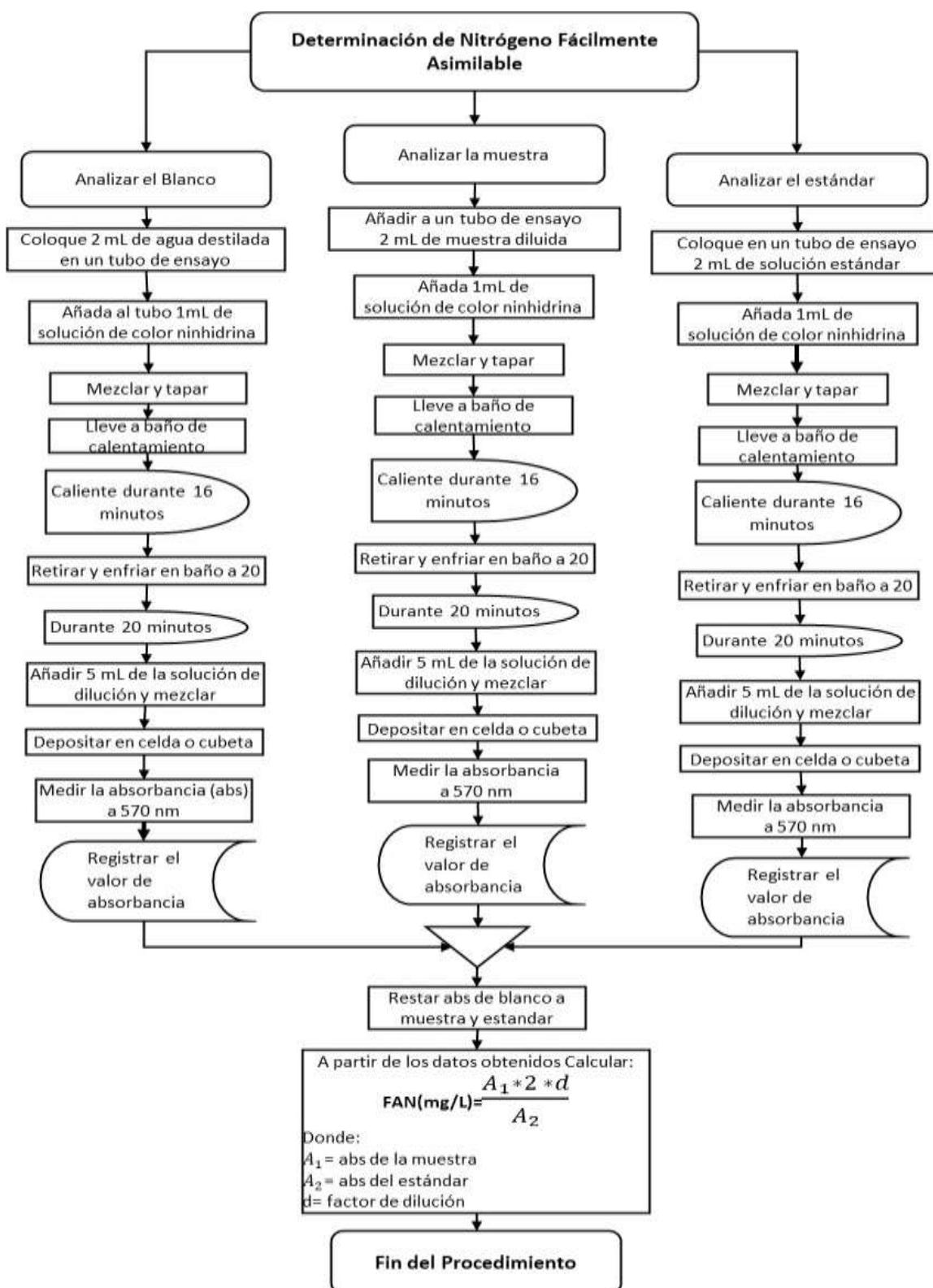


Diagrama para la Ejecución del Método de Análisis OPA – Enzimático

Para desarrollar el procedimiento se debe contar con los siguientes reactivos y la muestra a analizar, así:

- Reactivos: solución de N-acetil-L-cisteína (NAC), solución de O-ftaldialdehído (OPA), solución buffer de ácido bórico-borato, agua destilada; estos reactivos para el método OPA, mientras que para el método enzimático será necesario contar con enzima GLDH, solución buffer de 2-oxoglutarato estabilizada, reactivo NADH y agua destilada.
- Muestra: debe hallarse libre de partículas en suspensión, para lo cual puede emplearse la centrifugación y/o filtración; se recomienda desgasificar para eliminar CO₂. De acuerdo a la concentración esperada y el rango de cada método puede diluirse empleando para ello agua destilada.

El diagrama que se presenta a continuación se diseña de acuerdo a la metodología descrita por Megazyme (2020), Megazyme (2012) y Megazyme (2005); en donde se registran las acciones que deben llevarse a cabo mediante indicaciones concretas para la ejecución de cada uno de los métodos siguiendo un esquema lógico que permita llegar a la determinación de los analitos de interés.

Ilustración 14.

Diagrama método OPA-Enzimático

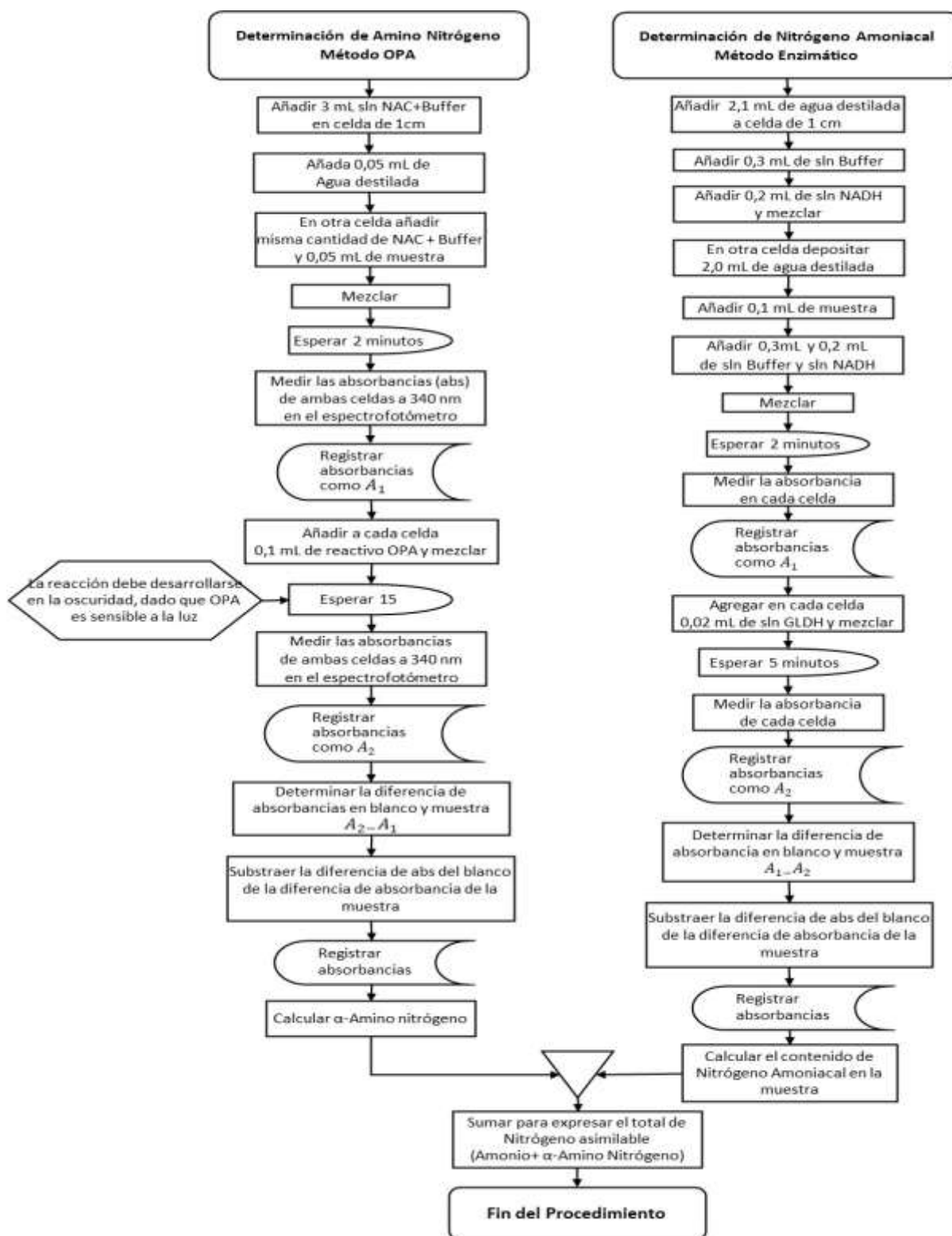


Diagrama para la Ejecución del Método de Análisis de HPLC

Para desarrollar este procedimiento se debe contar con una serie de reactivos y soluciones, que en general deben ser tipo HPLC, es decir reactivos que son elaborados específicamente para este tipo de técnicas analíticas.

Para este método se requiere:

- Fase móvil A: compuesta por un 95 % de solución de acetato de sodio 0,05 M y 5% de metanol.
- Fase móvil B: compuesta por una solución metanol/acetonitrilo en una relación 70/30.
- Solución OPA/NAC 1:5
- Agua tipo HPLC
- Muestra: debe hallarse libre de partículas en suspensión, para lo cual puede emplearse la centrifugación y filtración; se recomienda desgasificar para eliminar CO₂.
- Respecto al equipo y accesorios a emplear se indica: cromatógrafo líquido, desgasificador, bomba binaria, muestreador automático, detector de fluorescencia excitación y emisión de 330 nm y 440 nm.

Este diagrama se diseña de acuerdo a la metodología analítica descrita por Kelly et al. (2010); donde se indica cada acción en forma concreta a fin de facilitar el desarrollo lógico del procedimiento.

Ilustración 15.

Diagrama método HPLC

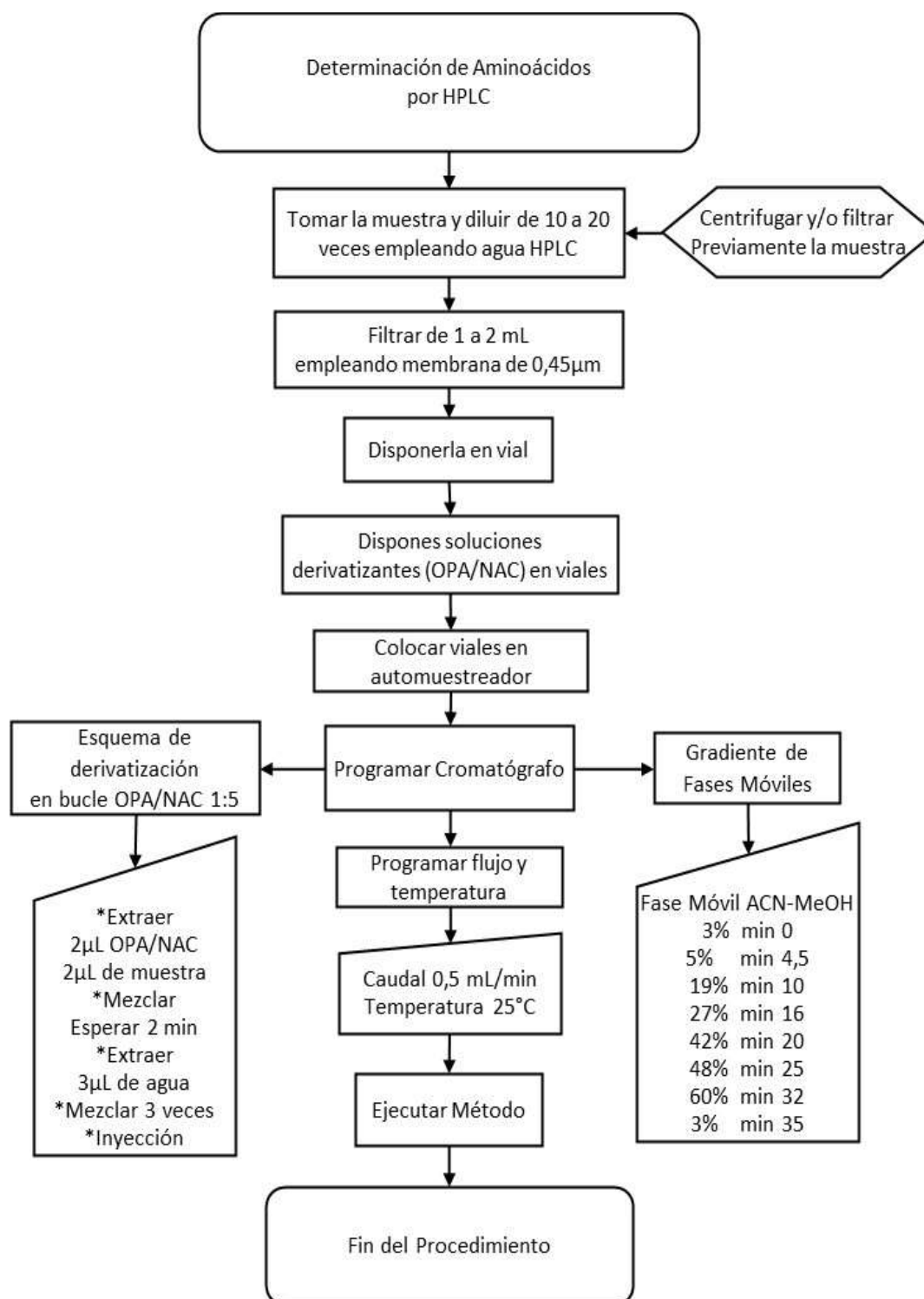


Diagrama para la Ejecución del Método de Análisis de FT-IR

Para desarrollar el procedimiento se debe establecer previamente los datos de referencia, a partir de los cuales se desarrollará el modelo que se empleará en el equipo FTIR ; las muestras problema son entonces presentadas al equipo. Para establecer el modelo se debe contar con:

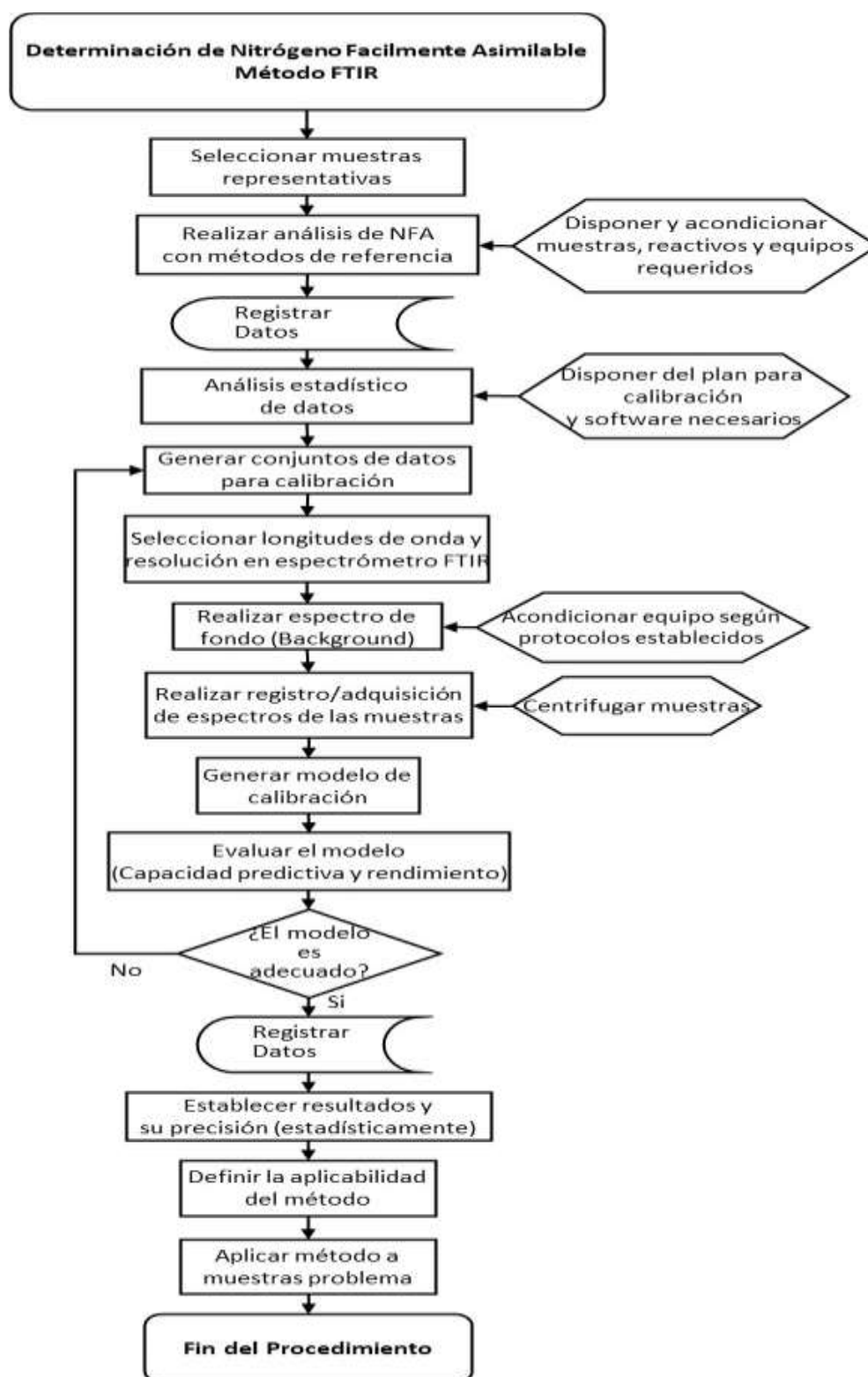
- Reactivos: los necesarios para implementar el método o métodos de referencia.
- Muestra: su preparación de acuerdo a los requerimientos de los métodos de referencia.

El desarrollo del análisis mediante FTIR para este caso no requiere reactivos, dado que se tratará de una muestra líquida; sin embargo, de acuerdo a la literatura se recomienda que las muestras sean centrifugadas previamente.

El diagrama que se presenta a continuación se diseñó de acuerdo a la metodología descrita por Petrovic (2018) y Skoutelas et al. (2011); en este diagrama se registran las acciones que conllevan a generar un modelo adecuado a partir del cual se pueda predecir con precisión la concentración de NFA en una muestra.

Ilustración 16.

Diagrama Método FTIR



Aplicabilidad de los Métodos de Acuerdo a las Características de Desempeño.

Las características de desempeño son elementales en la decisión de selección de un método, igualmente pueden serlo la información suministrada o disponible sobre el método, su aplicación y sobre dichas características. Otras consideraciones más generales pueden tomarse en cuenta al momento de la selección, como por ejemplo las limitaciones económicas, el tiempo, condiciones locativas o de personal. En este capítulo se realiza análisis sobre cada método en estudio partiendo de la información que se ha recolectado a lo largo del proceso investigativo y en especial a los datos registrados en la matriz comparativa.

Se incluye una descripción de los acrónimos que fueron empleados en la literatura investigada y que se considera importante informar debido a algunas diferencias que se hallaron y que podrían ser condicionantes en la consideración de selección de determinado método.

Contenido:

Aspectos relacionados con el empleo de los acrónimos para referirse a las fuentes de Nitrógeno que asimila la levadura.

Aplicabilidad de los métodos en estudio, según análisis de las características de desempeño.

Aspectos Relacionados con el Empleo de los Acrónimos para Referirse a las Fuentes de Nitrógeno que Asimila la Levadura

A lo largo del desarrollo investigativo sobre los métodos empleados para cuantificar el nitrógeno asimilable por la levadura, se hallaron expresiones como YAN, FAN, NFA o PAN, que son acrónimos empleados para referirse de forma corta a esa fracción de nitrógeno; sin embargo, parece ser que el acrónimo empleado en algunos casos condiciona la fracción de nitrógeno a la que se refiere; frente a otros registros donde no hay tal condición. Al mencionar que se “condiciona” se indica que: dado que la fracción de nitrógeno asimilable por la levadura está conformada por dos tipos de compuestos que son los alfa-aminoácidos individuales y el amoníaco, algunas expresiones están indicando sólo un tipo de compuesto asimilable y no a ambas fuentes de nitrógeno.

Por ejemplo Suriñach (2017) describe YAN como la suma de FAN y amonio, por tanto FAN solo se referiría a los amino nitrógenos libres; por su parte Hill y Stewart (2019) mencionan que se utilizan varios términos para definir los componentes nitrogenados que la levadura puede asimilar como YAN, FAN o PAN; sin embargo el término YAN se usa generalmente para describir ambas fuentes de nitrógeno asimilable, el acrónimo proviene de *Yeast Assimilable Nitrogen* y es mayormente usado en discusiones sobre el mosto de vino.

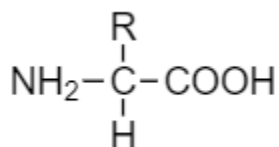
De igual forma se observó que no hay una unanimidad para uso de los acrónimos, ya que en textos relacionados a la industria cervecera o vinícola o de otro tipo, el uso de los términos y acrónimos varía. Se pueden observar algunos datos específicos en la Tabla 4.

Probablemente las diferencias surjan por la cultura en cada tipo de industria, la necesidad de emplear dichos términos y acrónimos en diferentes idiomas y lo que implica su traducción.

Dicho esto, veamos que la traducción de YAN (*Yeast Assimilable Nitrogen*) indicaría *nitrógeno asimilable por la levadura* con lo cual se referirá a las dos fuentes asimilables; por otra parte, el acrónimo FAN lo suelen expresar como *free alpha-amino nitrogen*, para el caso del acrónimo PAN como *primary amino nitrogen*, e interpretando la traducción de lo que indicarían estos términos, se estaría haciendo alusión sólo a las fuentes de nitrógeno provenientes de aminoácidos primarios, ya que, *amino* indica al grupo funcional (-NH₂) que lo contienen todos los aminoácidos; *alpha* (α) y *primary* son términos empleados para indicar la posición de un grupo funcional respecto al primer átomo de carbono en una cadena carbonada, que de igual forma estará indicando que se trata de un compuesto orgánico, respecto a esta última indicación conviene recordar que en la estructura de un α -aminoácido, el grupo amino, el grupo carboxilo, la cadena lateral R y un hidrógeno se hallan unidos a un carbono α “alpha” (Ilustración 17).

Ilustración 17.

Estructura genérica de un aminoácido



Estas diferencias en el significado de los acrónimos y lo que se desea expresar puede llevar a cometer errores de interpretación e influenciar la selección de un determinado método de análisis.

Tabla 4.
Variaciones en el Empleo de Acrónimos

Acrónimo Empleado	Descripción del acrónimo	Analitos a los que hace alusión	Aplicado en¹⁰	Origen del documento	Referencia
FAN	Free alpha-amino nitrogen	α -amino nitrógeno libre	Malta-Mosto (Industria cervecera)	Oslo (Noruega)	Lie (1973) Presentado en nombre del comité de análisis de EBC
FAN	Free amino nitrogen	Alfa-aminoácidos	Cerveza	Arizona (EE.UU.)	Otama, et al., (2013)
FAN	Free amino nitrogen	Aminoácidos, amonio, además el grupo terminal α -amino nitrógeno de péptidos y proteínas.	Mosto-Cerveza	Europa	EBC Analytica (2015)
FAN	Amino nitrógeno libre	Aminoácidos, el amoníaco y los grupos alfa-amino terminales de los péptidos y las proteínas.	Mosto-Cerveza	Alemania	Merck KGaA (2020)
FAN	Free amino nitrogen	α -aminoácidos	Industria vinícola	Portugal	Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, (2007)
YAN	Is the sum of the nitrogen content of primary amino acids and ammonium	Aminoácidos primarios y amonio	Industria Vinícola (Vino)	Australia	Dukes (2010)
YAN	YAN: Yeast Assimilable Nitrogen	YAN=Nitrógeno que puede ser usado por la levadura (Iones amonio y aminoácidos)	Industria Vinícola	España	Suriñach (2017)
FAN	FAN: free amino nitrogen	FAN= aminoácidos primarios			
FAN YANC	FAN: Free α -aminoacid nitrogen; YANC yeast assimilable nitrogen compounds.	YANC: α -Aminoácidos (FAN) y Ion amonio	Industria Vinícola	EE.UU.	Gump et al. (2002)

¹⁰ Hace referencia al tipo de muestra o matriz sobre la que trata el documento que emplea el acrónimo.

Acrónimo Empleado	Descripción del acrónimo	Analitos a los que hace alusión	Aplicado en	Origen del documento	Referencia
NFA YAN PAN	NFA (Nitrógeno fácilmente asimilable) = YAN (Yeast assimilable nitrogen)	NFA= Ion amonio (NH ₄ ⁺) y nitrógeno amínico primario (PAN) aportado por aminoácidos.	Mosto-Vino	España	Muñoz y Tobeña (2013)
NFA	Nitrógeno fácilmente asimilable	NFA= α-aminoácidos libres, amonio y algunos péptidos pequeños	Industria Vinícola	Francia	Lallemand (2015)
YAN PAAN AN	YAN: Yeast Available Nitrogen PAAN: Primary amino acid nitrogen AN: Ammonia Nitrogen	YAN= (AN+PAAN) Nitrógeno de amonio y nitrógeno de aminoácidos primarios. PAAN= Nitrógeno de aminoácidos primarios	Industria Vinícola	Australia	Vintessential Laboratories (2013); Vintessential Laboratories (2017)
YAN PAN	YAN: Yeast available nitrogen PAN: Amino nitrógeno primario	YAN: Iones amonio libres + nitrógeno amino primario (PAN)	Vino-Jugo de Uva y otros.	Irlanda	(Megazyme (2005), Megazyme (2012), Megazyme (2020)
YAN FAN	YAN: Yeast assimilable nitrogen. FAN: Free amino nitrogen	YAN: (FAN) Amino nitrógeno libre y Ion amonio.	Industria Vinícola	Sudáfrica	Petrovic (2018); Petrovic et al. (2020)
YAN FAN	YAN: Yeast assimilable nitrogen FAN: free amino nitrogen	YAN: (FAN)amino nitrógeno libre y Ion amonio.	Sidra de manzana	EE.UU.	Boudreau et al., (2017)

Aplicabilidad de los Métodos en Estudio, Según Análisis de las Características de Desempeño

Son 5 métodos descritos en el presente documento, los cuales están dirigidos a cuantificar las fuentes de nitrógeno asimilables por la levadura; a partir de la información registrada en la matriz y ahondando sobre algunos de los parámetros y características registradas, se desarrolla a continuación un análisis crítico de los diferentes métodos.

Partiendo de la premisa que el método que se emplee para una determinación debe ser adecuado al fin previsto, es decir que cuantifique los analitos de interés; en este caso trata exclusivamente de dos tipos de compuestos, ya que, nuestro analito de interés está conformado por α -amino nitrógeno (proveniente de aminoácidos primarios) y el ion amonio (fracción mineral); los cuales según la literatura son las fuentes de nitrógeno que puede metabolizar la levadura. Aun existiendo otras fuentes de nitrógeno dentro de una muestra, tales como proteínas o aminoácidos secundarios, la cuantificación del analito que es de interés se espera sea exclusiva a las fuentes metabolizables.

Teniendo en cuenta el alcance de los métodos y analizando su selectividad, se puede indicar que el método de Formaldehído y de Ninhidrina presentan una respuesta originada por analitos que no son de interés, las reacciones en cada método no son específicas para los compuestos indicados como NFA debido a que en ambos casos se ha confirmado se estima parcialmente la prolina; además de ello ninhidrina reacciona parcialmente con hidroxiprolina y con el ácido γ -amino butírico (GABA) el cual no es un α -aminoácido. De igual forma se

considera que el SO₂ puede interferir en las reacciones del método de formaldehído, aunque para este caso algunos autores describen el empleo de peróxido de hidrógeno para eliminar dicha interferencia. Se puede evidenciar que la especificidad del método se ve afectada en ambos casos por compuestos que, conteniendo nitrógeno, pueden generar datos sobreestimados de NFA a razón de compuestos que no son asimilables.

Por su parte los métodos combinados OPA/Enzimático presentan interferencia: en OPA por la presencia de iones amonio, sin embargo, se indica que dicha interferencia se elimina dando un tiempo de reacción prudente para asegurar que la reacción sea exclusiva con los aminoácidos presentes (excluyendo la prolina, no reacciona con este aminoácido); en el método enzimático se atribuye una posible interferencia para la reacción enzimática por cuenta de las sustancias coloreadas como los taninos, aunque esto puede ser manejado con procesos de decoloración de las muestras, para las cuales incluso el fabricante del kit de análisis recomienda por ejemplo el uso de polivinilpolipirrolidona (PVPP) con filtración; como vemos aunque existen algunas posibles interferencias para estos métodos combinados se indica como pueden ser resueltos estos inconvenientes.

Para el método HPLC, considerando, que el método descrito con mayor profundidad en este documento es de aplicación exclusiva para determinar los aminoácidos en vino, se debe indicar que como tal no cubre el requerimiento de cuantificación y detección de los compuestos que conforman el NFA, dado que la fracción de ion amonio no se estaría determinando. Respecto a este importante aspecto, existen algunos autores que describen métodos HPLC que indican su aplicación para ambos compuestos junto a otros de importancia en muestras de vino; sin

embargo, se requiere asegurar el desempeño del método en todos los analitos de interés; dado que como se ha indicado anteriormente existen algunas desventajas en la cuantificación específica de algunos aminoácidos que tiene relación con la reacción de derivatización empleada. Aun así, este método no reporta interferencia (con el empleo de derivatizantes OPA/NAC) por los demás componentes de la matriz. Adicional a ello este tipo de métodos permite que se identifique los analitos de interés teniendo en cuenta el tiempo de retención de cada compuesto y comparándolo con el tiempo de retención de un patrón de composición conocida; ya que el tiempo de retención se considera como una propiedad identificativa de cada compuesto (Hernández, 2010). En ese orden la separación cromatográfica genera una señal que corresponde a un analito concreto, donde se identifican picos que corresponden con los analitos de interés y así cuantificarlos.

En relación con el método FTIR; es un método muy rápido que permite identificar más de un parámetro a la vez dada la interacción de las moléculas con ciertas longitudes de onda dentro del IR, que permiten que se den fenómenos debido a la vibración en los enlaces químicos presentes; la capacidad del método para predecir cierto parámetro (en nuestro caso el NFA) parte de la calidad de datos empleados para crear el modelo de calibración que luego permita la correlación de los espectros con los datos contenidos en el conjunto de datos de referencia (los empleados en la calibración). De acuerdo a lo observado por Petrovic, (2018) es importante observar con detención los picos de absorción que puedan generar el agua y el azúcar, ya que pueden superponerse con la absorción de los picos que corresponde a grupos NH_2 y cadenas laterales de los aminoácidos. Con IR las soluciones acuosas son difíciles de analizar dada la presencia de agua y su alta absorbancia; por ello en aplicaciones enológicas es conveniente que

se realice un procesamiento al espectro generado a fin de aumentar la sensibilidad y evitar la posible interferencia del agua; lo cual también puede evitarse empleando la configuración de reflexión total atenuada (ATR), con una celda de flujo cuya trayectoria óptica esté entre 10 y 20 μm para mediciones de transmisión (Ricci, Parpinello, Laghi, Lambri y Versari, 2014).

Respecto al intervalo de trabajo de los métodos descritos en este documento, en general se hallan dentro del rango que se espera debe hallarse NFA para el desarrollo de un buen proceso fermentativo; aunque HPLC describe concentraciones mucho más bajas como rango de aplicación, cabe hacer la observación que muchos métodos presentan buenos resultados aun cuando fuera necesario realizar diluciones de la muestra y de hecho la literatura registra que para el análisis de las muestras por HPLC fue necesario realizar diluciones de muestra hasta 20 veces; en el caso del método enzimático, recomiendan dilución de la muestra en caso de ser necesario para que se halle dentro del rango del método, dicha dilución se tiene en cuenta en el cálculo final como factor de dilución (F). Dependiendo del tipo de matriz, las concentraciones naturales del NFA varían; por ejemplo, en mostos de uvas González (2000) describe valores de NFA: “entre 40 y 559 mgN/L, con un promedio de 213 mgN/L”(p.5). En el caso de la malta (empleada en la elaboración de cerveza) NFA se halla entre 180 y 220 mg/L (Stewart, 2013).

Un tercer aspecto a considerar es el tiempo que tarda en reportarse el resultado tras la ejecución de un método analítico, ya que, en general sobre procesos productivos el resultado reportado es elemento decisivo sobre acciones operativas del lote muestreado y el control del proceso; por ello es conveniente que el tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta el reporte del resultado sea el menor tiempo posible. Entre los métodos analizados, se puede

identificar que el método por HPLC es el que consume mayor tiempo en generar un resultado, aunque la ventaja de esta técnica si se compara con el método de Formol, es que el desarrollo del análisis es automático; solo se requiere personal para preparar la muestra y disponerla en el vial; lo que es completamente opuesto al método de Formol en el cual es necesario que el personal esté presente durante todo el tiempo de análisis. En su opuesto el método que tarda menos tiempo en su desarrollo es el FTIR, para el cual las muestras no requieren mayor preparación y el análisis tarda unos 2 minutos.

Es importante considerar el tiempo de ejecución del análisis, de acuerdo al entorno en que se desea aplicar la determinación, conviene tener claro pues generalmente en el caso de procesos productivos, se toman decisiones sobre la marcha, de ahí que es necesario tiempo cortos de respuesta más aun cuando son diferentes tipos de análisis, a una o diferentes muestras para las cuales se determinan parámetros con alguna frecuencia analítica constante.

Otro de los aspectos que se consideran en este documento y que se halla relacionado con la seguridad y salud en el trabajo, es el impacto que pueda generar el empleo de los reactivos necesarios para ejecutar cada método; a excepción del método FTIR, para el cual no es requerido ningún tipo de reactivo, fuera de los empleados en el desarrollo del modelo de calibración y su mantenimiento; los demás métodos descritos presentan uso de reactivos de forma permanente para su ejecución diaria, empleando reactivos que presentan clasificaciones que pueden ir desde “Corrosivo” hasta “ Puede provocar cáncer” o “Muy tóxico para organismos acuáticos”, como el caso del método de formaldehído el cual emplea un volumen permanente de formol, reactivo sobre el cual se debe tener extremo cuidado por la afectación que puede genera en la salud de

quien lo manipula y claramente en relación a la disposición de los residuos que se genera durante la ejecución del análisis.

Cabe indicar que la mayoría de los reactivos son empleados en diluciones (excepto el formaldehído, en el método formol) cuyas concentraciones varían desde % v/v hasta partes por millón. La peligrosidad de los reactivos empleados es un aspecto para considerar cuando se aplica un método, más aún cuando se conoce sobre las interacciones adversas que pueden generar tanto en el hombre como en el medio ambiente y lo que ello implica; conscientes además de la necesidad de reducir nuestro impacto y buscar alternativas en nuestros procesos que los hagan más sustentables. Esto dicho desde la óptica de la química verde donde se menciona la necesidad de: evitar la producción de residuos, emplear sustancias no tóxicas en la síntesis, generar productos biodegradables, minimizar el potencial de accidentes químicos, entre otros aspectos citados dentro de los 12 principios sobre los cuales se halla estructurada la filosofía de la química verde. Desde esta óptica el método menos favorecido es el de formol, no solo por los peligros que implica el uso del reactivo, sino también por el hecho de que su ejecución implica un contacto permanente del personal durante toda la ejecución de análisis lo cual incrementa los riesgos; sumando a ello el volumen de residuos que se genera, es realmente elevado, alrededor de 125 ml por muestra, lo cual si se compara con los demás métodos descritos, incluso con HPLC y su fase móvil, la cantidad que genera el método de formol es notablemente alta frente a los demás.

Es conveniente mencionar, por último, un aspecto que de igual forma condiciona el empleo de un método; se trata de los requerimientos de equipos y talento humano. Si bien a nivel

de laboratorios es común el empleo de elementos, materiales, consumibles y equipos que son de uso generalizado y fácilmente se pueden hallar en cualquier otro laboratorio; algunos métodos de análisis en cambio requieren el empleo de equipos especializados y por consiguiente de habilidades y conocimientos con los que debe contar el elemento humano para su operación. Dado que no en todos los casos los laboratorios cuentan con la disponibilidad o facilidad de adquisición de algunos equipos, este factor puede limitar la implementación de un método. En el caso del presente documento y teniendo en cuenta los métodos estudiados, se hallan métodos que no requieren una elevada inversión en equipos como por ejemplo el método de Formaldehído e incluso podríamos mencionar los métodos de Ninhidrina, OPA/NAC ya que los equipos necesarios para su aplicación son de fácil adquisición y operación; caso contrario con los métodos HPLC y FTIR que se podría decir, se trata de métodos cuya implementación requiere una gran inversión inicial, dado los costos de los equipos, además de la necesidad de contar con personal con habilidades y conocimientos para su operación. Sin mencionar, que además de la inversión, es necesario asegurar su funcionamiento a lo largo del tiempo, lo cual puede implicar planes de mantenimiento, calibración y otras acciones que garanticen la confianza de los resultados emitidos a partir de dichos equipos. No obstante, los aspectos de inversión pueden equilibrarse con la calidad de los resultados que se logra con el empleo de estos equipos, como se observó en la matriz de comparación los datos sobre la evaluación de la precisión de los métodos en condiciones de repetibilidad no distan mucho de los generados por los demás métodos de estudio; además la característica del tiempo de análisis, como se indicó anteriormente, favorece claramente al método FTIR, ya que puede generar un mayor número de resultados en razón del tiempo.

Conclusiones y Recomendaciones

En general los métodos descritos en el presente documento son empleados en diferentes tipos de industria para cuantificar las fuentes de nitrógeno asimilables por la levadura; ya que este parámetro es relevante para un buen desempeño de este microorganismo; se hace excepción del método HPLC descrito, el cual específicamente indica su aplicación para aminoácidos, es decir que solo identifica una fracción del NFA de interés; aunque como se mencionó dentro de la descripción, bajo la misma técnica se hallan alternativas de métodos que pueden emplearse, asegurando previamente su desempeño, para identificar y cuantificar las dos fuentes de nitrógeno asimilable.

La determinación de estos analitos se ve asociada a procesos fermentativos; los cuales se desarrollan en diferentes lugares a lo largo del mundo, dado que no hay uniformidad en el empleo de los términos y acrónimos, con los que se describe o con los que se menciona este parámetro se recomienda:

- Tener claro que el nitrógeno asimilable por las levaduras es la suma de dos tipos de compuestos.
- Asegurar a qué analitos hace referencia el término que se emplee, ya que pueden cometerse errores en la traducción o interpretación.
- Siempre resulta conveniente tener claro el alcance de un método (indistintamente si se trata de métodos para NFA), y que la respuesta a una medición debe ser originada por el analito de interés.

- Independientemente de con que nombre sea denominado un método conviene asegurar para que fin está previsto, que analitos identifica o cuantifica.
- Se sugiere emplear la expresión YAN para referirse al NFA, aun cuando su acrónimo proviene del idioma inglés, su traducción da una clara indicación de a qué hace referencia.
- En caso de requerirse mencionar el término específico de uno u otro de los componentes de YAN, se sugiere hacerlo describiendo cada uno, es decir “Nitrógeno asimilable a partir de α -aminoácidos” o “nitrógeno asimilable a partir de Ion Amonio”
- En general los métodos descritos cuantifican las dos fuentes de nitrógeno asimilable por la levadura.
- Efectivamente también existen métodos de análisis que determinan únicamente una de las fuentes de NFA (ejemplo método OPA o método Enzimático).

Se logró identificar un interferente que es común en varios métodos; la prolina; ya que puede generar una cuantificación sobreestimada del contenido de NFA en una muestra, aun tratándose de una fuente de nitrógeno que la levadura no asimila.

En todos los métodos es recomendado un tratamiento previo de la muestra que consiste en centrifugación y/o filtración para eliminar partículas en suspensión.

Existe una ventaja clara del método FTIR, frente a los demás métodos, dado que no requiere uso de reactivos y genera resultados en muy corto tiempo, lo cual puede ser ventajoso

en procesos donde se requiera en análisis de numerosas muestras, sin embargo, para su implementación es importante asegurar la calidad de los datos empleados en la calibración.

Existe una desventaja clara del método de formol: debido a la peligrosidad del formol, el tiempo que tarda el desarrollo del análisis y que implica una constante presencia del personal, el volumen de muestra requerido para el análisis y por consiguiente el volumen de residuos que deben manejarse.

Por último, es importante indicar que antes de emplear un método de análisis es necesario asegurar su desempeño dentro del laboratorio donde se pretende emplear, lo cual implica desarrollar procesos como la verificación o validación del método.

Referencias

Abbiotek. (2017). *Nitrógeno fácilmente asimilable información de estudio*. ABBIotek Partners in Fermentation. <https://abbiotek.com/perch/resources/maurivin-yeast-assimilable-nitrogen-research-information-march-2017-web.pdf>.

Agilent Technologies, Inc., (2021). *Conceptos básicos de la espectroscopia FTIR*. Agilent. <https://www.agilent.com/en/support/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/ftir-spectroscopy-basics-faqs>

Agudelo, D., y Vásquez, J. E. (2009). *Estudio sobre la utilización de espectroscopia infrarrojo para medir la concentración de glucosa en sangre* [Tesis de Pregrado, Universidad Autónoma de Occidente] <https://red.uao.edu.co/bitstream/handle/10614/1150/TBM00278.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Alonso, S., Gutiérrez, I., y Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 608–613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>

AOAC International. (2005). *AOAC Official Method 945.30 Characteristics of Wort*.

Assis da Veiga, C. A. (2014). *Quantificação de azoto facilmente assimilável de uvas brancas e tintas da Tapada da Ajuda em dois anos consecutivos (2013 e 2014). Validação e comparação da titulação formol e FT-MIR* [Tesis de Maestría, Instituto Superior de Agronomía Universidade de Lisboa] Repositorio da Universidade de Lisboa.
<http://hdl.handle.net/10400.5/8225>

ASTM International. (2014). *ASTM D6423-14, Standard Test Method for Determination of pHe of Denatured Fuel Ethanol and Ethanol Fuel Blends.*

Basalekou, M., Pappas, C., Tarantilis, P. A., y Kallithraka, S. (2020). Wine Authenticity and Traceability with the Use of FT-IR. *Beverages* 6(30), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/beverages6020030>

Bauer, R., Nieuwoudt, H., Bauer, F. F., Kossmann, J., Koch, K. R., y Esbensen, K. H. (2008). FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry*, 80(5), 1371–1379.
<https://doi.org/10.1021/ac086051c>

Bell, S. J., y Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>

Bely, M., Sablayrolles, J., y Barre, P. (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of*

fermentation and bioengineering, 70(4), 246-252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)

Biosystems S.A. (2020). Nitrógeno amínico primario o-Ftaldialdehído (OPA).

<https://es.biosystems.es/downer.aspx?f=MTI4MDdjLnBkZg==&t=TWV0aG9kcw==>

Boudreau, T. F., Peck, G. M., O'Keefe, S. F., y Stewart, A. C. (2017). Free amino nitrogen concentration correlates to total yeast assimilable nitrogen concentration in apple juice. *Food Science & Nutrition*, 6(1), 119–123. <https://doi.org/10.1002/fsn3.536>

Buglass, A. J. (Ed). (2011). *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. John Wiley y Sons Ltd.

Callejón, R. M., Tesfaye, W., Torija, M. J., Mas, A., Troncoso, A. M., y Morales, M. L. (2008). HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology*, 227(1), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0697-6>

Callejón, R. M., Troncoso, A. M., y Morales, M. L. (2010). Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta*, 81, 1143–1152. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.040>

- Casalta, E., Sablayrolles, J. M., y Salmon, J. M. (2013). Comparison of different methods for the determination of assimilable nitrogen in grape musts. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.009>
- Castellanos, I., Velandia, J., González, M., Varela, D., y Ramírez, E. (2018). *Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800 de Shimadzu*. Ediciones EAN. <http://editorial.universidadean.edu.co/media/pdf-ean/aplic-genera-espectrofoto.pdf>
- Castillo, G., Carballo, A., y Ramírez, J. (2019). Reacciones de derivatización por epoxidación y tosilación para separación de mezclas complejas de esteroides. *Colección Memorias de Los Congresos de La Sociedad Química de México 54° Congreso Mexicano de Química y 38° Congreso Nacional de Educación Química* 106–108. <https://sqm.org.mx/wp-content/uploads/2021/04/CMC-SQM-QORG1-2019.pdf>
- Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., y Riponi, C. (2010). Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1501–1507. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.011>
- Correia, C. A. (2011). *Espectroscopia de infravermelho na análise de mostos e vinhos* [Tesis de maestría, Universidade de Aveiro]. Ria repositório institucional Universidade de Aveiro. <http://hdl.handle.net/10773/8108>

Roberts, J. D. y Caserio, M. C. (2021, marzo 5) *25.4 Analysis of amino acids*. Chemistry

Libretexts

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Basic_Principles_of_Organic_Chemistry_\(Roberts_and_Caserio\)/25%3A_Amino_Acids_Peptides_and_Proteins/25.04%3A_Analysis_of_Amino_Acids#25-4A_The_Ninhydrin_and_Related_Tests](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Basic_Principles_of_Organic_Chemistry_(Roberts_and_Caserio)/25%3A_Amino_Acids_Peptides_and_Proteins/25.04%3A_Analysis_of_Amino_Acids#25-4A_The_Ninhydrin_and_Related_Tests)

Dubernet, M., Dubernet, M., Grasset, F., y García, A. (2001). Analyse de l'azote assimilable dans les moûts par Interférométrie Infrarouge à Transformée de Fourier. *Revue Française d' Oenologie*, 187(1), 9–13. <http://dubernet.com/pdf/publications-scientifiques/rfoe187.pdf>

Dukes, B. (2010). What is yeast assimilable nitrogen (YAN) and how much is needed? En C. E. Butzke (Ed.), *Winemaking problems solved* (pp. 52–76). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845690188.52>

EBC Analytica. (2015). *Free amino nitrogen in wort by spectrophotometry – Manual Method (IM)-2015*. Knowledge Center Brewup by the Brewers of Europe. <https://brewup.eu/ebc-analytica/wort/free-amino-nitrogen-in-wort-by-spectrophotometry-manual-method-im/8.10.1>

EBC Analytica. (2017). *9.10.2 Free amino nitrogen in beer by discrete analyser (NOPA Method)*. Knowledge Center Brewup by the Brewers of Europe. https://www.analyticalsolns.com.au/product/discrete_analyser_professional.html

Escuela de Vitivinicultura presidente Tomas Berreta (2013) *Guías prácticas de análisis y control de mostos y vinos (A.C.M.V.) Módulo enológico I.*

https://laboratorioacmv.weebly.com/uploads/2/2/3/6/22360620/guia_m._enol_i_versin_6__agosto-13_.pdf

Fabrice Lorenzini et Ágnes Dienes-Nagy. (2016). Azote assimilable des moûts: de quoi parle-t-on? *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 48(5), 330–331.

https://www.revuevitiarbohorti.ch/wp-content/uploads/2016_05_f_859.pdf

Filipe-Ribeiro, L., y Mendes-Faia, A. (2007). Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*, 100(3), 1272–1277.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.006>

García, M. del C. y Bermejo, M. J. (2006) *Laboratorio de bioquímica, Técnico Sup. En Laboratorio de Diagnóstico Clínico.* Editorial MAD. Google libros

https://books.google.com.co/books?id=B3XbyZ_5NcYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

Geisler, J., y Weiß, N. (2015). Free Amino Nitrogen (FAN) Measurement in beer using an Eppendorf BioSpectrometer. *Short Protocol Eppendorf*, (09), 10–12.

https://www.eppendorf.com/uploads/media/Protocol_009_-_Free_Amino_Nitrogen__FAN__Measurement_in_Beer_using_an_Eppendorf_BioSpectrometer_02.pdf

Giddings, J. C. y Keller, R. A. (2020) *Chromatography. Encyclopedia Britannica*. Britannica.

<https://www.britannica.com/science/chromatography>.

Giraldo, G. A., Chamorro, N. L., y Doria, C. M. (2010) *Laboratorio de Bioquímica: una visión práctica*. Armenia, Quindío: Ediciones Elizcom. Google libros

https://books.google.com.co/books?id=dAbMDrXcTHsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Sparrow, C., Morge, C., y Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiology*, (83), 71–85.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.008>

Gomis, D., Lobo, A. M., Alvarez, M. D., y Alonso, J. J. (1990). Determination of amino acids in apple extracts by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, (29)3/4,

155–160. <https://doi.org/10.1007/BF02268703>

González, A. (2000) *Nitrógeno fácilmente aprovechable para las levaduras* [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica de Chile]

https://www.researchgate.net/publication/265683519_Nitrogeno_facilmente_aprovechable_para_las_levaduras

González, A. (2010) *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Google libros

<https://books.google.com.co/books?id=v7asFduLUFsC&pg=PA21&dq=potenciometr%C3%ADa+medicion+de+pH&hl=es->

419&sa=X&ved=2ahUKEwjfmvPmx6HuAhWjEVkFHTQQC1IQ6AEwAXoECAMQAg
#v=onepage&q=potenciometr%C3%ADa%20medicion%20de%20pH&f=tru

González, Á. (2019). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular* (3rd ed.). Editorial Elsevier. Google libros

https://books.google.com.co/books?id=oACiDwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., y Whiton, R. S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4), 325–329.

<https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/49450/325.full.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hernández, A. G. (2010) *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Editorial Elsevier. Google Libros

https://books.google.com.co/books?id=TGqg1EcTF70C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

Hernández, L. y Pérez, C. (2002). *Introducción al análisis instrumental*. Editorial Ariel S.A. Google Libros

https://books.google.com.co/books?id=yVYn7_MoaAIC&printsec=frontcover&dq=análisis+instrumental+espectrofotometria&hl=es-

419&sa=X&ved=2ahUKEwi4zqKhn73vAhUKjVkJKHSkyC3gQ6AEwCXoECAkQA#v=onepage&q=análisis%20instrumental%20espectrofotometria&f=true

Hernández, M. J. (1988). *Estudio y aplicaciones analíticas de las reacciones de la cistina, cisteína y N-acetil-L-cisteína con el o-ftaldehído* [Tesis de Doctorado, Universitat de Valencia]. <https://core.ac.uk/download/pdf/71029628.pdf>

Hernández, M., Villanueva, R., y Álvarez-Coque, M. (1990). Determination of Total Free Amino Acids with o-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-cysteine. *Microchemical Journal* (42), 288-293. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0026-265X\(90\)90057-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0026-265X(90)90057-C)

Hidalgo, J. (2018). *Tratado de enología*. Ediciones Mundi-Prensa. Google Libros https://books.google.com.co/books?id=og-CDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true.

Hill, A. E., y Stewart, G. G. (2019). Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation5010022>

Instituto de Salud Pública Chile. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”*. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición_1.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Tecnica_1_validacion_de_Metodos_y_determinacion_de_la_incertidumbre_de_la_medicion_1.pdf)

Jajic, I., Krstovic, S., Glamocic, D., Jaksic, S., y Abramovic, B. (2013). Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(6), 839–850. <https://doi.org/10.2298/JSC120712144J>

Jara, M., Cubillos, F. A., García, V., Salinas, F., Aguilera, O., Liti, G., y Martínez, C. (2014). Mapping genetic variants underlying differences in the central nitrogen metabolism in fermenter yeasts. *PLOS ONE*, (9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086533>

Khan Academy (2021). *Espectroscopia: la interacción de la luz y la materia. Cómo podemos usar la radiación UV-Vis y la radiación IR para determinar la estructura química y la concentración de soluciones*. Khan Academy.
<https://es.khanacademy.org/science/chemistry/electronic-structure-of-atoms/bohr-model-hydrogen/a/spectroscopy-interaction-of-light-and-matter>.

Khan Academy (2021). *La luz: ondas electromagnéticas, espectro electromagnético y fotones propiedades de la radiación electromagnética y los fotones*. Khan Academy.
<https://es.khanacademy.org/science/chemistry/electronic-structure-of-atoms/bohr-model-hydrogen/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>

Kelly, M. T., Blaise, A., y Larroque, M. (2010). Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7385–7392.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.047>

- Koga, R., Miyoshi, Y., Todoroki, K., y Hamase, K. (2017). Amino acid and bioamine separations. En *Liquid Chromatography* (Second Edi, pp. 87–106). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805392-8.00004-9>
- Lallemand. (2015). Información práctica sobre elaboración de vino, los numerosos roles del nitrógeno en la fermentación alcohólica. *Lallemand Oenology*. Lallemand. <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2017/06/Wine-Expert.-Los-numerosos-roles-del-nitrogeno-en-la-fermentacion-alcoholica.pdf>
- Li, D., Xu, X., Li, Z., Wang, T., y Wang, C. (2020). Detection methods of ammonia nitrogen in water: A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 127, (1-16) <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115890>
- Li, H., Qiu, T., Cao, Y., Yang, J., y Huang, Z. (2009). Pre-staining paper chromatography method for quantification of γ -aminobutyric acid. *Journal of Chromatography A*, 1216(25), 5057–5060. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.044>
- Lie, S. (1973). The EBC-Ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Brewing Industry Research Laboratory*, 79, 37–41. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>
- Linde (2021). *Analytical Methods, Liquid chromatography*. Linde. http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/index.html

Materials Evaluation and Engineering, I. (2014). *Fourier Transform-infrared spectroscopy*.

MEE. <https://www.mee-inc.com/hamm/fourier-transform-infrared-spectroscopy-ftir/>

Megazyme. (2005). *Amoniaco (Rápido) procedimiento de ensayo*.

https://www.vinotec.cl/images/pdf/2_Kit_Amonio_Rapido.pdf

Megazyme. (2012). *Primary Amino Nitrogen (PAN) Assay Procedure*.

https://www.fts.co.nz/image/data/PDF/K-PANOPA_1207_DATA.pdf

Megazyme. (2020). *Ammonia (Rapid) Assay Procedure*.

https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-AMIAR_DATA.pdf

Merck KGaA. (2017). *Ficha de Datos de Seguridad Potasio yoduro p.a. EMSURE ISO, Reag. Ph*

Eur (pp. 1–5). Merck. https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Potassium-iodide,MDA_CHEM-105043

Merck KGaA. (2020). *Manual métodos de análisis para la industria cervecera Spectroquant*

Prove. Merck. https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-ES-Site/es_ES/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-

[173017&DocumentId=201611.034.ProNet&DocumentUID=39334433&DocumentType=PI&Language=ES&Country=NF&Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-ES-Site/es_ES/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-173017&DocumentId=201611.034.ProNet&DocumentUID=39334433&DocumentType=PI&Language=ES&Country=NF&Origin=PDP)

- Mettler Toledo. (2016). Espectrofotometría UV/VIS Fundamentos y Aplicaciones. *Mettler-Toledo GmbH, Analytical*. Mettler Toledo. https://www.mt.com/dam/non-indexed/po/ana/uvvis/30364341A_V12.16_UVVIS_Spectrophoto_Guide_es_LR_12.12.16.pdf
- Muñoz, S., y Tobeña, A. (2013). Nitrógeno fácilmente asimilable. Sørensen vs. PAN/Amonio. *Revista Enólogos*, 84, 38–41. http://www.revistaenologos.es/download.php?type=doc&name=A36_Nitrogenofcilmenteasimilableweb.pdf
- Organización Internacional de Normalización ISO/IEC 17025. (2017). *Norma Internacional ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Tercera edición, Suiza.
- Otama, L, Tikanoj, S., Kane, H., Hartikainen, S., Kaski, L., y Suoniemi-kähärä, A. (2013). Beer Reference Sample Correlation Between Free Amino Nitrogen (FAN) and NOPA (Nitrogen by OPA). *2013 ASBC Annual Meeting*. <https://silo.tips/download/thermo-fisher-scientific-ratastie-2-vantaa-finland-2-thermo-fisher-scientific-st>
- Otama, Liisa, Tikanoja, S., Kane, H., Hartikainen, S., Kaski, L., y Suoniemi-kähärä, A. (2015). Correlation of the Free Amino Nitrogen and Nitrogen by O -Phthaldialdehyde Methods in the Assay of Beer. Thermo Scientific, 4. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-71798-DA-FAN-Nitrogen-Beer-AN71798-EN.pdf>

Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., y Vyvyan, J. (2009). *Introduction to spectroscopy (Fourth Edi)*. Editorial Brooks Cole CENGAGE Learning.

Perrett, D., y Nayuni, N. K. (2014). 23 Efficacy of current and novel cleaning technologies (ProReveal) for assessing protein contamination on surgical instruments. En Walker, J.T.(Ed.), *Decontamination Hospitals and Healthcare* (p.p 598-619) Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857096692.3.598>

Petrovic, G. (2018). *A survey of the YAN status of South African grape juices and exploration of multivariate data analysis techniques for spectrometric calibration and cultivar discrimination purposes* [Tesis de maestría, Stellenbosch University]. SUNScholar Research repository. <http://hdl.handle.net/10019.1/104952>

Petrovic, G., Aleixandre-Tudo, J. L., y Buica, A. (2019). Unravelling the complexities of wine: A big data approach to yeast assimilable nitrogen using InfraRed spectroscopy and chemometrics. *Oeno One*, 53(2), 107–127. <https://doi.org/10.20870/oenone.2019.53.2.2371>

Petrovic, G., Aleixandre-Tudo, J. L., y Buica, A. (2020). Viability of IR spectroscopy for the accurate measurement of yeast assimilable nitrogen content of grape juice. *Talanta*, 206 (1-7). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120241>

P. Industries (2004). *Cuarta Edición, Métodos analíticos para los procesos de fermentación y destilación a partir de materias primas provenientes de la caña.*

Prasad, B. (2020) *Chemical analysis and material characterization by spectrophotometry.*

Elsevier. Google Libros

https://books.google.com.co/books?id=iwvBDwAAQBAJ&source=gbs_navlinks_s

Quattrocchi, O. A., Andrizzi, S. I., y Laba, R. F. (1992) *Introducción a la HPLC aplicación y práctica.* Artes Gráficas Farro.

R-Biopharm Ag. (2020). Enzytec TM Liquid Ammonia Ref. N° E8390. [https://food.r-](https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2020/10/e-liquid_ifu_e8390_ammonia_en_v1.pdf)

[biopharm.com/wp-content/uploads/2020/10/e-liquid_ifu_e8390_ammonia_en_v1.pdf](https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2020/10/e-liquid_ifu_e8390_ammonia_en_v1.pdf)

Ress, O. J. (Ed.) (2010). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Developments, Techniques, and Applications.* Nova Science Publishers

Ricci, A., Parpinello, G., Laghi, L., Lambri, M., y Versari, A. (2014). Chapter 2: Application of infrared spectroscopy to grape and wine analysis. En D. Cozzolino (Ed.) *Infrared Spectroscopy Theory, Developments and Applications* (pp. 17–42). Nova Science Publishers.

Roca-Mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G., y Torija, M. J. (2020). Nitrogen preferences during alcoholic fermentation of different non-saccharomyces yeasts of oenological interest. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020157>

Sadjadi, S. (2019). Vamos a explorar las razones por las que la fase estacionaria C18 es la más usada en fase reversa y cómo funciona. Phenomenex.

<https://phenomenex.blog/2019/10/09/fase-estacionaria/>

Sgariglia, M., Soberón, J. R., Sampietro, D., y Vattuone, M. (2010). Cromatografía : Conceptos Y Aplicaciones. *Revista Arakuku, 1*, (1–6).

https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET_Digital_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Sharma, DC. y Riyat, M. (2015) *Biochemistry for dental students*. Wolters Kluwer Health.

Google Libros

https://books.google.com.co/books?id=azjvDwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gs_b_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true

Simkus, D. N., Aponte, J. C., Elsila, J. E., Parker, E. T., Glavin, D. P., y Dworkin, J. P. (2019).

Methodologies for analyzing soluble organic compounds in extraterrestrial samples:

amino acids, amines, monocarboxylic Acids, aldehydes, and ketones. *Life, 9*, (47) 1-30.

<https://doi.org/10.3390/life9020047>

Skoutelas, D., Ricardo-da-Silva, J. M., y Laureano, O. (2011). Validation and comparison of

formol and FT-IR methods for assimilable nitrogen in vine grapes. *South African Journal*

of Enology and Viticulture, 32(2), 262–266. <https://doi.org/10.21548/32-2-1386>

- Spedding, G. (2013). The World's Most Popular Assay? A Review of the Ninhydrin-Based Free Amino Nitrogen Reaction (FAN Assay) Emphasizing the Development of Newer Methods and Conditions for Testing Alcoholic Beverages. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71(2), 83–89. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2013-0411-01>
- Stewart, G. G. (2013). Biochemistry of Brewing. En M. Eskin y F. Shahidi (Ed.), *Biochemistry of Foods* (pp. 291–318). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091809-9.00007-8>
- Stewart, G. G., Hill, A., y Lekkas, C. (2013). Wort FAN - Its characteristics and importance during fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71(4), 179–185. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2013-0921-01>
- Subramanian, A., y Rodríguez-Saona, L. (2009). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. En D. Sun (Ed.), *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (pp. 145–178). Elsevier Inc. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9)
- Suriñach, A. (2017). *Method validation of enzymatic ammonia method and colorimetric free amino nitrogen method applied to wine industry* [Tesis de Pregrado, Universitat de Barcelona]. Diposit Digital Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/2445/107170>

Thermo Nicolet Corporation. (2001). *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*.

[https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/FTIR principles.pdf](https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/FTIR_principles.pdf)

Trujillo, A.; Vega, P., y Barajas, L. (2014) *Potenciometría: usos y aplicaciones*. *CienciaCierta*,

38. <http://www.cienciacierta.uadec.mx/2014/06/05/potenciometria-usos-y-aplicaciones/>

Ugliano, M., Henschke, P., Herdrich, P., y Pretorius, M.J. (2007). Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Industry Journal*, 22(6), 24-30.

<http://citeserx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.610.5251&rep=rep1&type=pdf>

Vargas, R., y Loaiza, H. (2011). Filtrado de señales en espectrofotometría de absorción mediante wavelets invariantes a la traslación. *Ingeniería e Investigación*, 31(3), 142–154.

<http://www.scielo.org.co/pdf/iei/v31n3/v31n3a16.pdf>

VIM. (2012). *VIM Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)*.

Vintessential Laboratories. (2013). *Kit de análisis para la determinación de alfa amino*

nitrógeno en jugo de uva. <https://www.vintessential.com.au/assets/datasheets/file/test-kit-instructions/espanol/2014/spanish-4a110-amino-acid-nitrogen-30-test.pdf>

Vintessential Laboratories. (2014). *Kit de análisis enzimático para la determinación de amoníaco en jugo de uva y en vino*.

<http://www.vintessential.com.au/assets/datasheets/file/test-kit-instructions/espanol/2014/spanish-4a120-enzymatic-ammonia-30-test.pdf>

Vintessential Laboratories. (2017). *Enzymatic test kit for the determination of ammonia in grape juice and wine*. <https://www.vintessential.com.au/assets/datasheets/file/test-kit-instructions/2018/4a120-ammonia-30-20072017.pdf>

Waters. (1993). *Waters 717plus Autosampler*. In *Waters 717 plus Autosampler Operator's Manual* (p. 188).

Yokohama, S., y Hiramatsu, J. (2003). A modified ninhydrin reagent using ascorbic acid instead of potassium cyanide. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95(2),204-205.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80131-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80131-7)