

ENZIMÁTICO vs FTNIR: COMPARACIÓN

Los sistemas de análisis más extendidos en enología son ciertamente el enzimático y el NIR (o mejor, FTNIR). Hay muchos partidarios de uno u otro sistema, que ciertamente tienen pros y contras, pero para compararlos es necesario saber cómo funcionan evaluando sus características y limitaciones.



Principio de funcionamiento de los sistemas enzimáticos.

Los sistemas enzimáticos basan su funcionamiento en la Ley de Lambert-Beer (la absorbancia (A) medida en una longitud de onda dada (λ) es linealmente proporcional a la concentración (C) de la sustancia y en la longitud del camino óptico (a) a través de una constante de proporcionalidad específica para cada sustancia llamada coeficiente de extinción molar (ϵ_λ): $A = C \cdot a \cdot \epsilon_\lambda$). Si tuviéramos una solución pura de una sustancia con ϵ_λ conocida, sería suficiente medir la absorbancia de la solución para determinar la concentración de la sustancia. Sin embargo, todas las muestras que se analizan, tanto en el campo enológico como en otras áreas, son soluciones muy complejas y la absorbancia es la suma de todas las contribuciones de las sustancias presentes en la muestra.

Sin embargo, hay sustancias que reaccionan específicamente con moléculas individuales, y solo con ellas (como sucede, por ejemplo, en una reacción enzimática, donde la enzima es un catalizador específico para una reacción dada). Incluso, a través de una o más reacciones químicas conectadas en cascada, pueden surgir nuevas moléculas que se distinguen del resto de la muestra por su alta absorción a longitudes de onda específicas. Por lo tanto, será posible a través de estas reacciones obtener una solución en la cual medir la absorbancia (o la variación de absorbancia frente al tiempo) que será proporcional exclusivamente al analito buscado.

Los sistemas enzimáticos, como DIONYSOS, están compuestos por un fotómetro, que mide las absorbancias, y de reactivos específicos para cada analito. Basta añadir la muestra a los reactivos para obtener un compuesto cuya absorbancia medida en una longitud de onda dada es proporcional a la concentración de analito bajo consideración. Esta proporcionalidad le permite construir rectas de calibración a partir de materiales de referencia de concentración conocida (calibrador), que pueden usarse más tarde para deducir la concentración del analito en la muestra.

Principio de funcionamiento de los sistemas FT-NIR

La interacción de la materia de luz también es la base de estos sistemas, pero se utilizan longitudes de onda menos energéticas (infrarrojos) en comparación con los métodos enzimáticos (UV-Visible).

La radiación electromagnética infrarroja hace vibrar los enlaces de las moléculas orgánicas, de forma que los diferentes grupos funcionales dentro de la molécula individual (por ejemplo $-NH_2$ o $-COOH$) son excitados por diferentes frecuencias. Si obtenemos la absorbancia de una sustancia pura en todas las longitudes de onda incluidas en un rango dado, obtendremos un gráfico característico de la sustancia (espectro). Si comparamos el espectro de una muestra que contiene múltiples sustancias, es posible identificarlos comparando el espectro obtenido con los correspondientes a las sustancias puras y, nuevamente a través de la comparación, determinar su concentración.

Sin embargo, los espectros obtenidos con los espectrofotómetros IR clásicos, no ofrecen suficientes características técnicas para poder realizar un análisis cuantitativo. Una técnica más moderna, llamada Transformada de Fourier en el infrarrojo cercano (FT-NIR), resuelve muchos de los problemas de la espectrofotometría IR clásica: tiene tiempos extremadamente rápidos, una alta relación señal/ruido y una resolución mucho más alta, lo que permite una mejor distinción de los diversos grupos funcionales orgánicos.

Los espectrómetros FT-NIR producen una señal, llamada interferograma, que contiene las absorbancias en todas las frecuencias analizadas codificadas dentro de él. Se produce a través de una señal luminosa que se divide en dos mitades y en la cual una mitad tendrá una longitud fija, mientras que la otra variará su longitud gracias a un espejo móvil. Cuando las dos señales se recombinan, producirán interferencias positivas o negativas de acuerdo con las diferentes longitudes. Esta nueva señal se pasa a través de la muestra y luego a un detector. La señal se puede medir muy rápidamente, realizando varias exploraciones por segundo. El interferograma se procesa luego a través de un proceso matemático llamado Transformada de Fourier, que da lugar al espectro de la muestra bajo examen. En este punto, el espectro de la muestra se analiza comparándolo con una base de datos de cientos de espectros diferentes de varias muestras en las que se han determinado los componentes de interés. La concentración de la muestra problema se estima estadísticamente mediante la comparación con la base de datos. Es decir, los resultados obtenidos no se miden realmente, sino que se obtienen a través de un análisis estadístico.

Pros y contras

Muchos de los métodos enzimáticos se han incluido entre los métodos oficiales de la OIV, mientras que el FT-NIR, que no puede calibrarse con estándares de referencia como es el caso de los sistemas enzimáticos, no reúne los requisitos para poder convertirse en método de referencia al no ser propiamente un método de medida. Eso no quiere decir que los métodos FT-NIR no sean válidos, sino que no podrán utilizarse para emitir valores certificados.

Los sistemas FT-NIR son extremadamente más rápidos y ofrecen un conjunto de resultados en solo unos segundos. Los sistemas enzimáticos son más lentos y requieren tiempos de incubación del orden de 5-10 minutos para completar las reacciones y proceder con las mediciones.

Los sistemas enzimáticos son de naturaleza "abierto" y todo el proceso de medición es visible y monitoreado; los diversos métodos deben ser calibrados y controlados, lo que requiere una cierta participación del operador que puede intervenir en cualquier momento para corregir problemas (turbidez de las muestras, por ejemplo). En cambio, los sistemas FT-NIR son "cajas negras cerradas" en los que no es posible intervenir en la medición, corregir la calibración o detectar interferencias que modifique la señal óptica. El procesamiento de la señal y el cálculo de los resultados se confía al software, que a su vez se apoya en una base de datos que es útil sólo en la medida en la que la muestra este perfectamente representada en el conjunto de datos utilizados.

Los sistemas enzimáticos tienen rangos de medición mucho más amplios que FT-NIR, y son mucho más sensibles. De hecho, el FT-NIR es incapaz de determinar adecuadamente concentraciones por debajo de los 0,2 g/L, aproximadamente ya que la relación señal/ruido es muy baja. Una sensibilidad adecuada es relevante para el enólogo en ciertos procesos, como el final de la fermentación alcohólica o el comienzo de la fermentación maloláctica, en la que es necesario reconocer cantidades extremadamente pequeñas de analito e identificar el momento adecuado para actuar.

Los reactivos enzimáticos son altamente específicos, de manera que solo reconocen la molécula de interés, siendo capaces de distinguir entre moléculas quirales. Por ejemplo, es posible distinguir en D- y L-, mientras que con FT-NIR siempre obtendrá solo la suma de los dos ya que ambas moléculas tienen idéntica estructura química y disposición de enlaces.

Otra diferencia importante entre los dos sistemas es su escalabilidad: un sistema FT-NIR ofrece resultados simultáneos para un conjunto definido de analitos. Aunque los FT-NIR no necesitan consumibles ni reactivos, este conjunto de analitos no puede modificarse ni reducirse, pero tampoco ampliarse, puesto que el resultado se genera a partir de una función matemática que los incorpora como parámetros; por tanto, si el analito no está incluido en la definición de dicha función (que a su vez viene generada por la base de datos utilizada) no podrá agregarse posteriormente.

ENZIMÁTICO vs FTNIR: COMPARACIÓN

Con los sistemas enzimáticos, por otro lado, al estar compuestos por un instrumento (fotómetro manual o automático) y reactivos (cada reactivo es específico para un solo analito), es posible elegir qué analitos para dosificar y no necesariamente todos deben dosificarse juntos. Esto conduce a una libertad total en el uso del sistema enzimático, que es mucho más flexible para las necesidades específicas y estacionales de la bodega.

Los sistemas FT-NIR explotan tecnologías muy avanzadas y software muy potente, que determinan un costo muy alto para la instrumentación y, aunque se requiere poco del operador en términos de mantenimiento diario, requieren mantenimiento periódico por parte de personal especializado con altos costos. Por otro lado, los sistemas enzimáticos, incluso los automáticos, aprovechan la tecnología consolidada que tiene menores costos, tanto iniciales como de mantenimiento.

Caraterística	FT-NIR	Enzimático
Analisis	Estimación estadística de la concentración frente a una base de datos	Medida cuantitativa de los analitos mediante reacciones enzimáticas específicas
Calibración	Sólo es posible ajustar el resultado mediante la comparación con otros métodos de análisis	Calibración con material de referencia
Manejo	Muy fácil de usar: basta con apretar un botón	Requiere cierta formación por parte del usuario
Monitoreo	Son 'cajas negras' cerradas que no permiten intervención	Son sistemas abiertos que permiten actuación
Coste	Muy costosos, pero no requieren consumibles o reactivos	Económicos, pero requieren consumibles y reactivos
Tiempo de respuesta	Resultados en menos de un minuto	Resultados entre 5 y 10 minutos
Mantenimiento	Poco, pero sólo lo puede realizar el fabricante por su complejidad (coste alto)	Mantenimiento diario y sencillo por el usuario, y periódico por el fabricante, de baja complejidad (coste bajo)
Sensibilidad y precisión	Escasa	Métodos muy sensibles y reproducibles
Escalabilidad	No es posible	Total
Reconocimiento OIV / AOAC	No son reconocidos	Bastantes métodos oficiales OIV (no todos)

Conclusiones

Los sistemas enzimáticos y el FT-NIR son sistemas totalmente diferentes y no es posible una comparación directa entre ellos, excepto cuando nos referimos a necesidades específicas de proceso. Muy a menudo, los dos sistemas se usan juntos, amplificando las ventajas y eliminando las desventajas. En muchas bodegas, durante los períodos de trabajo intenso, como la cosecha, los FT-NIR se utilizan para procesar numerosas muestras en poco tiempo, obteniendo resultados iniciales suficientes para tal fin. Más tarde, sin embargo, el uso de sistemas enzimáticos permite verificar los resultados con mayor precisión y exactitud y una mayor garantía de seguridad de los datos. Además, los sistemas enzimáticos se pueden usar como un método simple, económico y seguro para verificar y calibrar los sistemas FT-NIR.

Desde hace más de 10 años, el compromiso de Sinatech con el enólogo ha sido el trabajar codo con codo para proporcionarle las soluciones analíticas más adecuadas al control y seguimiento del proceso de vinificación. Métodos automatizados fácilmente adaptables a cualquier rutina de trabajo, con un equipo de asesoría personalizada para ayudarle a una implementación rápida y sin problemas.

Sinatech: TeamWork