

# IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE EN LOS MÉTODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS

Dr. Osmar Thomas Morillo Piña  
Reciclajes Industriales S.A. - Armony Sustentable, Chile  
Correo electrónico: otmp77@gmail.com y omorillo@armony.cl

Ing. Luishana Dudamell Graterol  
Oficina Estatal del Yaracuy del Servicio Desconcentrado de Normalización, Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos (SENCAMER), Venezuela.  
Universidad Nacional Experimental de las Fuerzas Armadas (UNEFA), Venezuela.  
Correo electrónico: luishanadudamell@gmail.com

## RESUMEN

La incertidumbre de las mediciones en los métodos de ensayos se debe a diversos factores, cada uno de ellos se calcula individualmente y se consideran un componente de la incertidumbre típica combinada, característica de los métodos complejos, en especial, aquellos donde la medición involucra una actividad biológica y sobre las cuales influyen diferentes factores. Identificar aquellos de efecto significativo, representa un paso fundamental en el cálculo de la incertidumbre de su medición. En este sentido, se presenta el análisis de las fuentes de incertidumbre en dos casos de estudio, el método de recuento en placa y el método de ensayo enzimático usando espectrofotometría UV-Vis. Los resultados se sintetizan y se representan gráficamente a través de un diagrama de causa y efecto, donde se presentan las posibles fuentes de incertidumbre que afectan ambos métodos y sirven de modelo conceptual para el análisis de otros similares. La exactitud de los resultados en la aplicación del método de recuento en placas, se centra en la capacidad del crecimiento de los microorganismos en condiciones de laboratorio y en los métodos de ensayo enzimáticos apoyados en la técnica espectrofotometría UV-Vis, están relacionados principalmente con las características intrínsecas de las enzimas, de sus propiedades como catalizador biológico y de la precisión en la medición espectrofotométrica. En ambos casos las condiciones ambientales del laboratorio, la naturaleza de las muestras y la experticia del analista también representan potenciales fuentes de incertidumbre en los métodos analizados.

**Palabras Clave:** *actividad biológica, incertidumbre, crecimiento microbiano, enzimas, moléculas de ADN.*

Recibido: 15/06/2021

Aceptado: 10/11/2021

*Revista In Situ/ISSN 2610-8100/Vol. 5 N°5/ Año 2022.  
San Felipe, Venezuela/Universidad Nacional Experimental del Yaracuy, pp 251 - 268.*

# IMPORTANCE OF IDENTIFICATION OF SOURCES OF UNCERTAINTY IN MICROBIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL ASSAYS METHODS

Dr. Osmar Thomas Morillo Piña  
Reciclajes Industriales S.A. - Armony Sustentable, Chile  
Correo electrónico: otmp77@gmail.com y omorillo@armony.cl

Ing. Luishana Dudamell Graterol  
Oficina Estatal del Yaracuy del Servicio Desconcentrado de Normalización, Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos (SENCAMER), Venezuela.  
Universidad Nacional Experimental de las Fuerzas Armadas (UNEFA), Venezuela.  
Correo electrónico: luishanadudamellg@gmail.com

## ABSTRACT

---

The uncertainty of measurements in test methods is due to several factors; each of them is calculated individually and is considered a component of the combined standard uncertainty, characteristic of complex methods, especially those where the measurement involves a biological activity and which are influenced by different elements. To identify those with a significant effect represents a fundamental step in the calculation of their measurement uncertainty. In this sense, the analysis of the sources of uncertainty is presented in two case studies, the plate count method and the enzymatic assay method using UV-Vis spectrophotometry. The results are synthesized and graphically represented through a cause and effect diagram, where the possible sources of uncertainty affecting both methods are showed and serve as a conceptual model for the analysis of other similar ones. The accuracy of the results in the application of the plate count method, focuses on the growth capacity of microorganisms under laboratory conditions and in the enzymatic test methods supported by the UV-Vis spectrophotometry technique, they are mainly related to the intrinsic characteristics of enzymes, their properties as a biological catalyst and precision in spectrophotometric measurement. In both cases, the environmental conditions of the laboratory, the nature of the samples, and the expertise of the analyst also represent potential sources of uncertainty in the methods analyzed.

**Keywords:** *biological activity, uncertainty, microbial growth, enzymes, DNA molecules.*

## INTRODUCCIÓN

Los métodos de ensayos microbiológicos o enzimáticos tienen diversas aplicaciones. Son ampliamente utilizados en los diagnósticos clínicos, en el control de calidad en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Su campo de aplicación se extiende a la agricultura, agroindustria y al medio ambiente; éstos juegan un papel fundamental en el campo de la investigación, desarrollo de productos, en la optimización y control de procesos industriales, Rivera (2015), Cerra et al, (2013) y Waites et al, (2001).

La importancia de la exactitud de los resultados en los métodos de ensayos microbiológicos o enzimáticos, involucra identificar y cuantificar las fuentes de dispersión de dicho valor, Cerra (citado). La estimación de la incertidumbre donde la determinación del valor de un mesurando está asociado a dichas actividades biológicas, son más complejos que los métodos químicos o físicos. Bajo este contexto se presenta un trabajo donde se analizan las posibles fuentes de incertidumbre en el método de recuento en placa y el método de ensayo enzimático usando espectrofotometría UV-Vis, presentados como casos de estudios en representación de los métodos de ensayos microbiológicos y biotecnológicos respectivamente.

## METODOLOGÍA

Un sistema de gestión de las mediciones, tiene como principal objetivo, gestionar el riesgo de que los equipos y procesos de medición que influyen en los resultados y que afectan a la calidad del producto de una prueba de ensayo microbiológicos y biotecnológicos. De acuerdo a lo expuesto, se crea un modelo para evaluar las diferentes fuentes de incertidumbre que afectan a los métodos mencionados y se analizan las diferentes variables que influyen en el proceso de medición que afectan la confiabilidad del valor del mesurando. Existirán algunas fuentes de incertidumbres cuyo valor no sea significativo y serán descartadas. Es por ello, que se realiza esta investigación de tipo descriptiva, donde se evaluaron las principales fuentes de incertidumbre en los métodos de ensayo microbiológicos y biotecnológicos que inciden directamente en garantizar la validez de los resultados de medición.

## INCERTIDUMBRE DE UNA MEDIDA

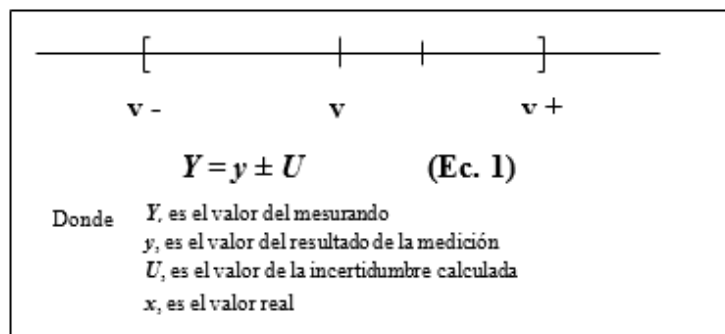
### ¿Qué son los métodos de ensayo?

“Es la descripción genérica de la secuencia lógica de operaciones utilizadas en una medición”, Vocabulario Internacional de Metrología, (p.33), es decir, son una serie de pasos que se aplican sistemáticamente con la finalidad de obtener experimentalmente uno o varios valores de una característica que se desea medir y puede atribuirse razonablemente a una magnitud, denominada mesurando. Los métodos de ensayo deben cumplir con los principios metroológicos respecto a validación, trazabilidad de la medición y estimación de la incertidumbre, EURACHEM/CITAC (2012).

### ¿Qué es la incertidumbre de una medida?

“Es un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la disper-

sión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando” Vocabulario Internacional de Metrología, (p.34), EURACHEM/CITAC (citados) e ISO/IEC 17025:2017. Dicho de otra manera, el valor de la incertidumbre permite establecer con determinado grado de confiabilidad un rango dentro del cual se encuentra el valor real (figura 1).



**Figura 1.** Representación gráfica y matemática del valor del mesurando y la incertidumbre

Cuando no se dispone de la información sobre la incertidumbre de una medida, se corre el riesgo de hacer interpretaciones erróneas de los resultados emitidos y en consecuencia, la toma de decisiones sobre estos resultados erróneos puede atraer consecuencias negativas, por ejemplo, la toma de decisiones sobre resultados erróneos en temas de la salud.

### Pasos para la estimación de la incertidumbre de medida

“Cuando se evalúa la incertidumbre de medición, se deben tener en cuenta todas las contribuciones que son significativas, incluidas aquellas que surgen del muestreo, utilizando los métodos apropiados de análisis” Cerra (citado) y para su determinación se tienen establecidos los siguientes pasos Vocabulario Internacional de Metrología, (p.34), EURACHEM/CITAC e ISO/IEC 17025:2017 (citados):

1. *Especificación del mesurando*: es la identificación de la magnitud que se desea medir. Representa la cantidad que caracteriza una propiedad o característica de una muestra o fenómeno. Es el punto de partida en la expresión del resultado mediante la aplicación de un método de ensayo.
2. *Identificación de las fuentes de incertidumbre*: son los factores que podrían modificar el valor de esa magnitud que se desea medir. Comprende desde la característica de los reactivos, preparación de las soluciones, sistema biológico, tratamiento matemático, condiciones ambientales del laboratorio, toma de muestra, instrumentación utilizada, entre otros factores. Las fuentes de incertidumbre se representan a través de un diagrama de causa-efecto, también llamado diagrama de cola de pescado o Ishikawa.
3. *Cuantificar los componentes de la incertidumbre*: una vez identificadas las fuentes de incertidumbre, se procede a cuantificar cada una de ellas, a través de la aplicación de ecuaciones específicas para cada caso (Ec. 2, 3 y 4, son ejemplos de fórmulas para la estimación de componentes de incertidumbre):

$$u_{\text{balanza}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n u_{\text{calibración}}^2 + u_{\text{resolución}}^2} \quad (\text{Ec. 2}) \quad u_{\text{repetibilidad}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$u_{\text{pipeta}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n u_{\text{calibración}}^2 + u_{\text{resolución}}^2 + u_{\text{cambio de T}}^2} \quad (\text{Ec. 4})$$

4. *Cálculo de la incertidumbre combinada*: después de estimar los componentes individuales o los grupos de componentes de la incertidumbre, el siguiente paso es calcular la incertidumbre estándar combinada. La relación general entre los componentes incertidumbre viene dada por la expresión:

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n u_{i(y)}^2} \quad (\text{Ec. 5})$$

Dónde:  $U(y)$ , es el valor de la incertidumbre combinada.

$u_{i(y)}$ , es el valor de cada componente de la incertidumbre.

5. *Cálculo de la incertidumbre expandida*: la etapa final consiste en estimar la incertidumbre expandida. Este valor representa el intervalo que comprende la distribución de valores, los cuales podrían ser atribuidos razonablemente al mesurando.

## Fundamentos Biológicos de los Ensayos Microbiológicos y Biotecnológicos

Los ensayos aplicados en el campo de la microbiología y la biotecnología donde la determinación del valor del mesurando es la medida de una actividad biológica, puede ser más compleja en comparación con una medición física o química. Ambas áreas de conocimiento se fundamentan en el estudio del crecimiento microbiano y en la replicación del ADN, respectivamente, y en fenómenos asociados como la actividad catalítica de las enzimas debido a su importancia en la regulación de funciones biológicas dentro de las células. Caso de estudio: fuentes de incertidumbre en los ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos se utilizan en la detección, aislamiento, cuantificación e identificación de microorganismos en muestras de diferente naturaleza. Tienen muchos campos de aplicación Rivera y Cerra (citados)

- ◇ Industria Alimentaria.
- ◇ Medicina
- ◇ Industria Farmacéutica y Cosmética
- ◇ Agricultura y Medio Ambiente

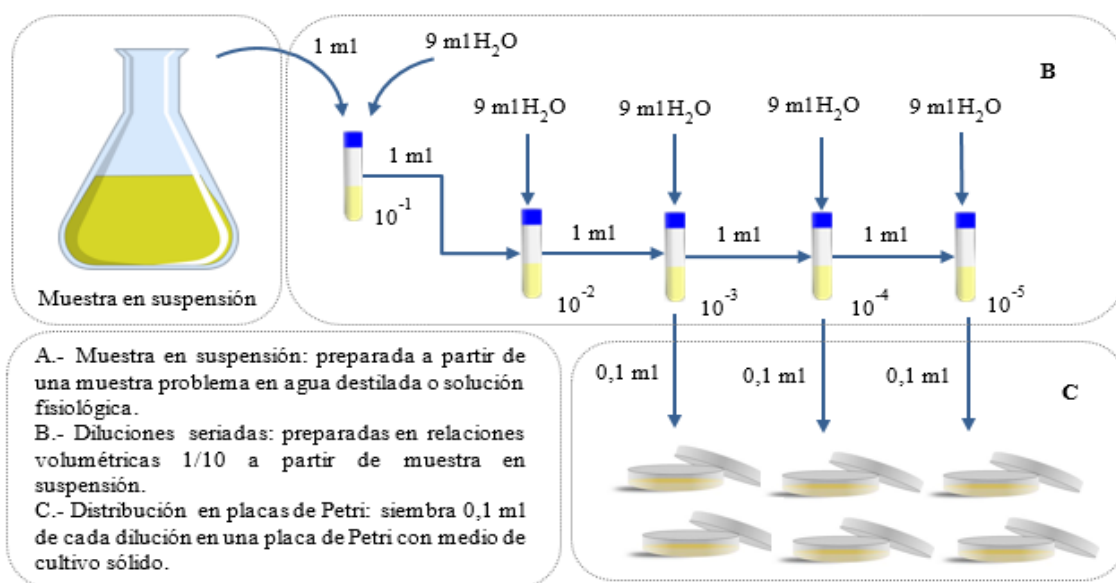
Los ensayos centrados en el crecimiento microbiano, miden número de colonias viables o la masa celular total. A continuación, se listan los principales métodos de medición de concentración de microorganismos más usados Cerra (citado), Dávila y Hernández

(2006), Niño y Torres (2016):

- ◇ Recuento en cámaras de Petroff-Hausser
- ◇ **Recuento en placa**
- ◇ Número más probable
- ◇ Determinación de peso seco
- ◇ Métodos turbidimétricos
- ◇ Recuento sobre filtros de membrana

El método de recuento en placa es uno de los métodos más utilizados para determinar el número de microorganismos viables, Niño y Torres (citado), su resultado se expresa en Unidades Formadoras de Colonia por cada mililitro o gramo de una muestra (UFC/ml o g). Cada UFC se origina a partir de una célula viable, desarrollada sobre un medio de cultivo solidificado con agar.

El método consiste en realizar diluciones seriadas a una relación 1/10, la primera se prepara a partir de una muestra en suspensión líquida. De cada dilución se toma una alícuota para realizar la siembra, distribuyendo uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo sólido contenido en una placa Petri. Las placas inoculadas son incubadas en condiciones favorables para el crecimiento de la especie de microorganismo en estudio, hasta observar la aparición de colonias, cada una de ellas se cuentan como un individuo. Al final del ensayo, el número de colonias contadas se relaciona con factor de dilución y la cantidad de muestras utilizadas, para así obtener el resultado, Cerra, Dávila y Hernández, Niño y Torres (citados). En la figura 2, se muestra la representación gráfica del método de recuento de placas.



**Figura 2.** Representación gráfica del método de recuento de microorganismos viables en placas

### Factores que afectan el método de recuento en placas

Son múltiples los factores que pueden generar la dispersión de los resultados en el conteo de microorganismos viables por el método de recuento de placas, Cerra, EURA-

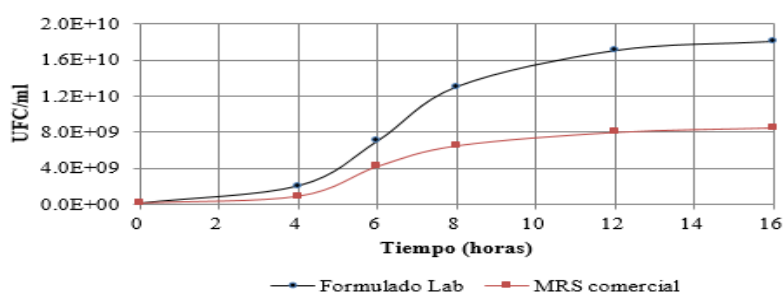
CHEM/CITAC, ISO/IEC 17025:2017 (citados), Gunar y Sakhno (2015) y Lyrio et al, (2014). Para efectos del presente análisis, fueron agrupados de la siguiente manera:

- a) El primer grupo, está relacionado a la naturaleza del microorganismo, especie, requerimientos nutricionales y condiciones de crecimiento.
- b) El segundo grupo, está representado por los factores relacionados al procedimiento de medición, método, desviaciones de los dispositivos volumétricos, calibración de equipos analíticos, cálculo y expresión de resultados, así como la habilidad del analista.
- c) El primer grupo son aquellos asociados a la muestra que se desea analizar. Estos factores comprenden las características, procedimiento de toma y tratamiento de la muestra, la estabilidad, representatividad con respecto al lote de origen y la homogeneidad durante la dilución de la muestra original.

### Fuentes de incertidumbre en el conteo de microorganismos viables por el método de recuento en placas

La naturaleza de los microorganismos representa la principal fuente de variabilidad en la cuantificación de microorganismos viables. Su crecimiento depende de los requerimientos nutricionales junto a las condiciones de cultivo. En este sentido, se analizan los factores que afectan al crecimiento de los microorganismos durante su cuantificación en el laboratorio:

**Medio de cultivo:** la cantidad y la disponibilidad de nutrientes incide directamente en el desarrollo de los microorganismos. La fórmula de un medio de cultivo debe satisfacer los requerimientos según el tipo y especie en estudio; cualquier déficit de un nutriente limita el crecimiento de la población microbiana o un exceso puede provocar inhibición, generando una desviación en el resultado final. En la figura 3, se muestra la sensibilidad del método debido a la composición del medio de cultivo. Se observa variación en el crecimiento de una cepa de *Lactobacillus sp*, en un medio de cultivo específico (Agar MRS). En ambos casos la fórmula tiene la misma composición, sin embargo, uno es una mezcla comercial lista para disolver y la otra preparado en el laboratorio. El ensayo se inició utilizando el mismo inóculo (concentración  $7,2 \times 10^7$  UFC/ml) e iguales condiciones de incubación, sin embargo, se observa una diferencia en la velocidad de crecimiento y en la concentración final; en consecuencia, una dispersión de los resultados.



**Figura 3.** Curva de crecimiento de una cepa de *Lactobacillus sp* en medio MRS. Incubados a 32 °C, bajo anaerobiosis. Fuente: Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos de la Universidad de Los Andes.

**pH:** los microorganismos tienen un pH óptimo para el crecimiento o para la excreción de determinados metabolitos. Cada especie crece en un rango definido de pH y permite establecer una clasificación según este parámetro, Frioni (2005):

- ◇ Acidófilos entre 0 y 5,5
- ◇ Neutrófilos entre 5,5 y 8,0
- ◇ Alcalófilos entre 8,5 y 11,5

La variación del pH en el medio de cultivo puede ionizar los nutrientes y reducir su asimilación por parte de los microorganismos e inclusive, si los cambios son muy extremos, puede inhibir la actividad metabólica, causar disminución del crecimiento e inclusive la muerte, Rodríguez (2016). Los microorganismos modifican el pH del medio mediante la liberación de metabolitos ácidos o básicos para evitar estas variaciones, se incorpora al medio de cultivo soluciones amortiguadoras. La variación de este parámetro puede afectar la población microbiana en estudio y en consecuencia, arrojar resultados alejados de los valores reales.

**Concentración de oxígeno:** los microorganismos requieren oxígeno elemental (O) para la síntesis de componentes bioquímicos, sin embargo, no todos necesitan oxígeno atmosférico (O<sub>2</sub>). Según el requerimiento de oxígeno se clasifican en:

- ◇ Aerobios: requieren O<sub>2</sub> para crecer, pueden ser estrictos o microaerófilos. Ejemplo: los hongos y las bacterias aeróbicas.
- ◇ Anaeróbicos facultativos: no requieren O<sub>2</sub> pero cuando está presente lo utilizan.
- ◇ Anaerobios aerotolerantes: no requieren ni utilizan O<sub>2</sub>.
- ◇ Anaerobios estrictos: no sólo no requieren O<sub>2</sub> sino que les resulta altamente tóxico, induciendo alteraciones metabólicas y la muerte, Junco y Rodríguez (2001).

En el cultivo de microorganismos en placas, el oxígeno proviene del microambiente de la placa y de la cámara de incubación. En aquellos casos donde se requiere condiciones anaeróbicas se emplean dispositivos especiales para extraer, reemplazar u oxidar el oxígeno. Independientemente de la técnica de anaerobiosis empleada, se debe asegurar la ausencia total de O<sub>2</sub> y evitar variabilidad en el crecimiento de los microorganismos, como lo observado por Obando et al, (1999), quienes en su estudio en el cultivo de bacterias anaerobias como *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. sporogenes*, observaron variaciones debidas posiblemente a variaciones del método de anaerobiosis evaluados.

**Temperatura:** es otro factor fundamental en el crecimiento de los microorganismos y debe ser controlado durante la ejecución del método de ensayo. En este sentido, las incubadoras, termómetros, termohigrómetros deben estar calibrados. La sensibilidad a la variación de la temperatura sobre el crecimiento de un microorganismo varía de una especie a otra, tal como se observa en la tabla 2. Los cultivos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, llevados a cabo en medio de cultivo preparado con glucosa, peptona y extracto de levadura, con el mismo inóculo e incubados con 5 °C de diferencia, presentaron diferencia en el recuento de colonias debido al cambio de temperatura.

**Tabla 2.** Cultivo de una cepa de levadura *Sacharomyces* sp, incubados en medio YPG, durante 12 horas.

Temperatura (°C)	pH inicial	Agitación (rpm)	Recuento UFC/ml
30	4,96	150	1,68*10 <sup>8</sup>
35	4,96	150	6,8*10 <sup>9</sup>

Fuente: Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos de la Universidad de Los Andes.

Además de los factores antes mencionados que afectan el crecimiento microbiano, existen otros elementos que contribuyen con la incertidumbre de la medición en el método de recuento en placa:

**Instalaciones y condiciones ambientales del laboratorio:** deben responder a las características del método, así como de la naturaleza de las muestras, ISO/IEC 17025:2017 (citado) y G02 R00 (2017). Las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad relativa deben ser controladas para evitar la menor variación posible. La intensidad de la luz, la dirección y la presión del aire en el laboratorio, también forman parte de los parámetros que deben ser controlados en el laboratorio, Guerrero y Sánchez (2003).

**Representatividad de la muestra:** debe permitir generalizar los resultados obtenidos durante su análisis a la población objeto de estudio. El tamaño, protocolo de toma y la homogeneidad de la muestra son fuentes de variabilidad en el conteo de microorganismos viables por recuento en placa. La estabilidad es otro factor fundamental para obtener resultados representativos. Depende en gran medida de la naturaleza de la muestra, el tiempo de traslado desde el lugar de la toma al laboratorio, condiciones de traslado y el resguardo en el laboratorio hasta el momento del análisis. Para ello, se utilizan dispositivos de recolección estériles, herméticos y deben ser apropiados para el estado y cantidad de muestra que se desea analizar.

Las consecuencias de un manejo inadecuado de una muestra conducen a resultados erróneos. Un ejemplo de la gravedad de una detección desviada, se puede apreciar en los diagnósticos de infecciones, donde un resultado erróneo implica decisiones terapéuticas equivocadas y como consecuencia un impacto negativo en el tratamiento y control de la infección, Mühlhauser y Rivas (2014).

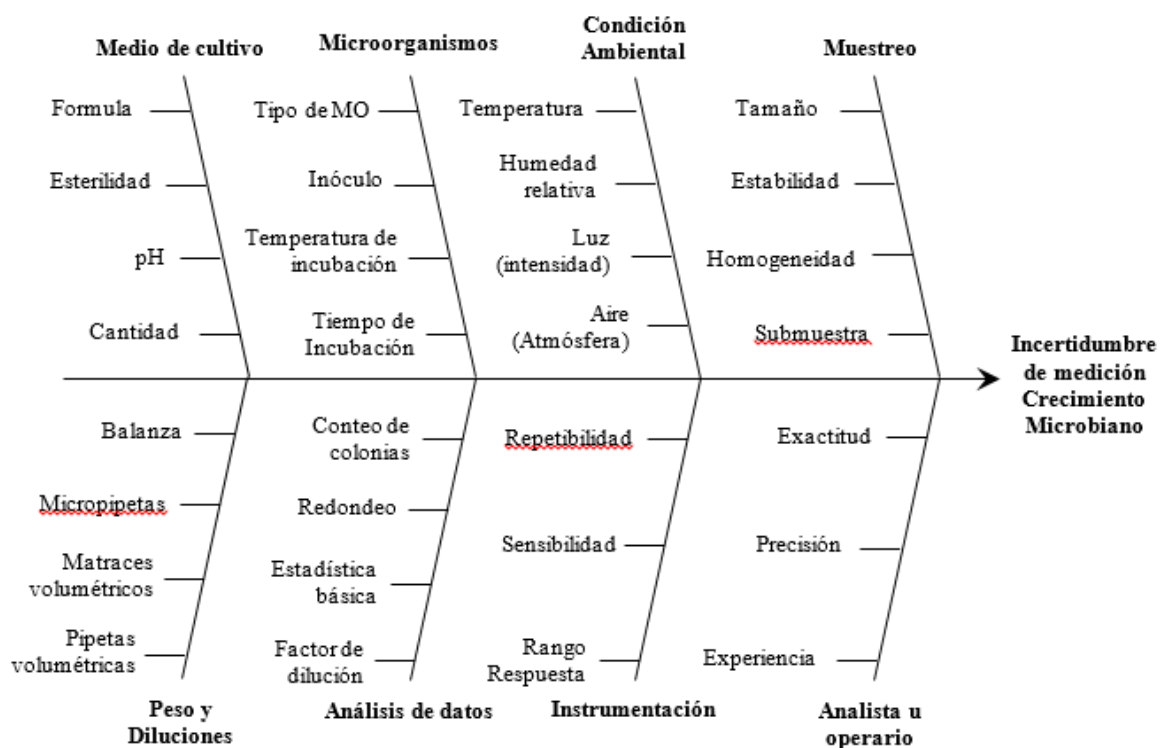
**Operaciones de pesado y diluciones seriadas:** introducen variabilidad en los resultados, las balanzas y los dispositivos volumétricos deben estar calibrados, en especial, estos últimos debido al tamaño de los volúmenes de dilución, entre 100 microlitros y 10 mililitros. La menor variación en la medición de estos volúmenes provoca desviación en los resultados del método.

**Cálculo y expresión de resultados:** la aplicación de operaciones matemáticas como el redondeo, cálculo de medias, desviación estándar, son otros aspectos que incrementa la incertidumbre en la medición, así como la apreciación del analista en la definición y el conteo de colonias de microorganismos.

**La instrumentación:** la incertidumbre generada por la instrumentación no solamente está asociada a la balanza, para la cual se debe conocer la repetibilidad, sensibilidad y el rango de respuesta, sino también la incertidumbre asociada a las estufas de incubación donde el control de la temperatura es fundamental. En el caso de cultivos anaeróbicos, se debe conocer la incertidumbre arrojada por las jarras o cámaras de anaerobiosis según sea el caso.

**El analista:** la experiencia y precisión en la ejecución del método de recuento de microorganismos, las variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales y el criterio de definición de una Unidad Formadora de Colonia, pueden introducir dispersión en los valores observados.

De acuerdo a lo analizado anteriormente, se presenta una representación gráfica de las principales fuentes de incertidumbre que afectan el conteo de microorganismos mediante el método de recuento en placas (figura 4).



**Figura 4.** Diagrama de causa y efecto de las principales fuentes de incertidumbre que afectan el conteo de microorganismos mediante el método de ensayo de recuento en placas

### Caso de Estudio: Fuentes de Incertidumbre en Los Ensayos Enzimáticos

Los ensayos enzimáticos se fundamentan en la capacidad de las enzimas de catalizar reacciones específicas. Se aplican con tres propósitos diferentes:

- (i) Identificar una enzima para probar su presencia o ausencia en una muestra Hans (2014).
- (ii) Determinar la cantidad de enzima presente en una muestra, Hans (2014).
- (iii) Cuantificación de un compuesto mediante la formación de producto o con-

sumo de sustrato.

### Campo de aplicación:

- ◇ Análisis Clínico. En la determinación de metabolitos como la glucosa, colesterol, ácido úrico y actividades enzimáticas, como marcadores hepáticos y cardíacos.
- ◇ Industria Alimentaria. Ampliamente utilizados en las determinaciones de contenido de etanol, glicerol, carbohidratos en alimentos, entre otros.
- ◇ Otros campos de aplicación están en el control de calidad en la industria farmacéutica y cosméticos, en la agricultura, microbiología, entre otros.
- ◇

Los ensayos enzimáticos donde se utiliza la espectrofotometría UV-Vis, se basa en la demostración “in vitro” de la actividad catalítica, siguiendo la evolución de alguno de los elementos que intervienen en la reacción con capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda. Si la actividad enzimática está siendo determinada por la aparición del producto, el análisis se realiza midiendo el incremento de la absorbancia a una longitud de onda específica. Si, por el contrario, el análisis está enfocado en la desaparición del sustrato, la interpretación de los resultados se realiza analizando la disminución de la absorbancia Hans (2014) y Roca y Rodríguez (2003).

### Factores que afectan los métodos de ensayos enzimáticos usando espectrofotometría UV-Vis

Son múltiples los factores que pueden generar la dispersión de los resultados en los ensayos enzimáticos usando espectrofotometría UV-Vis, Gunar y Sakhno, Lyrio et al, Hans y Roca, Rodríguez (citados) y Rami y Canalías (2015). Para efectos del presente análisis, fueron agrupados de la siguiente forma:

- a) El primer grupo, está relacionado con las características intrínsecas de las enzimas y de sus propiedades como catalizador biológico de reacciones específicas.
- b) El segundo, proviene del procedimiento de medición, las operaciones de dilución y pesado, el tamaño de la muestra, cantidad de enzima y los volúmenes de trabajo. La calibración de los equipos, la experiencia del analista y el procesamiento de datos.
- c) El tercer grupo, lo comprenden aquellos factores que afectan directamente las mediciones espectrofotométricas, como las características de la cubeta, los blancos (reactivos) utilizados, el valor del coeficiente de absorción molar del compuesto en estudio, entre otros.

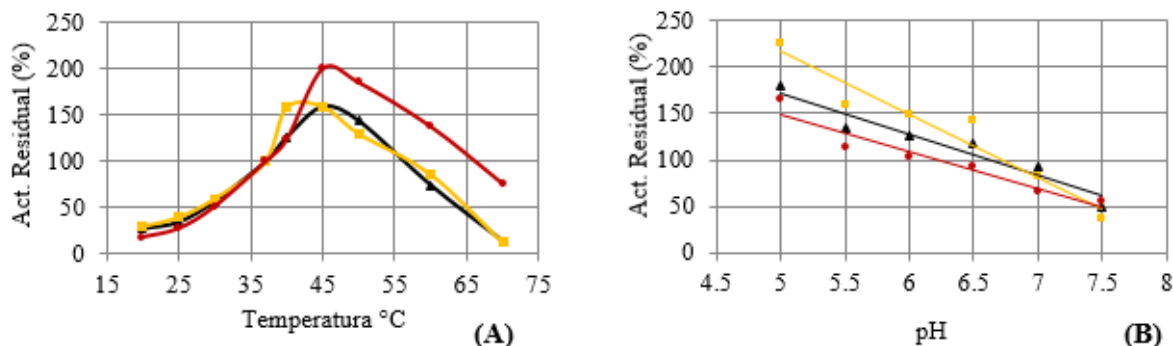
### Fuentes de incertidumbre en los Ensayos Enzimáticos

La dispersión de los resultados en un método enzimático, es consecuencia de la variación en la actividad catalítica de la enzima, la cual es afectada por diversos factores como la temperatura, pH, concentración de enzimas y sustrato, presencia de inhibidores, cofactores, entre otros. A continuación, se analizan los principales factores que afectan la actividad enzimática:

**Temperatura:** todas las enzimas tienen un rango óptimo de temperatura en la cual expresan la mayor actividad catalítica, fuera de este intervalo se registra disminución de

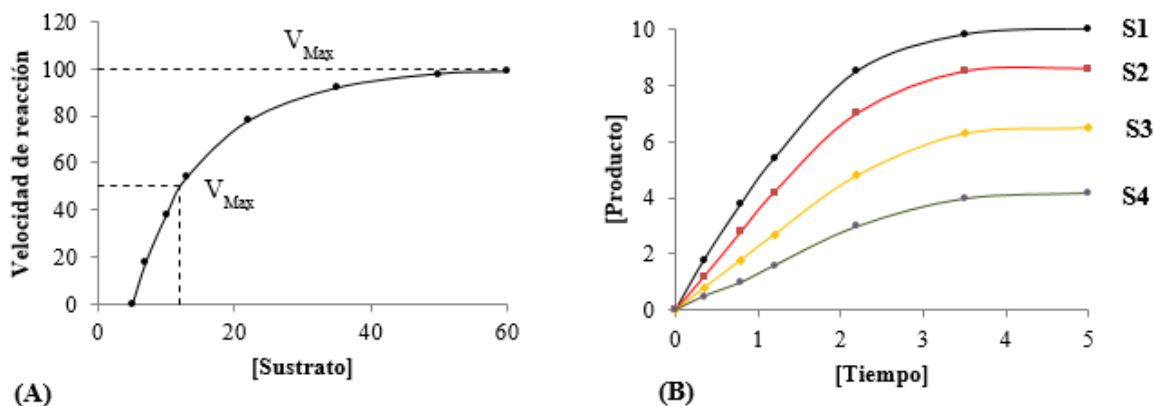
la actividad, Hozbor y Lodeiro (2017). En la figura 9A, se muestra un ejemplo de este fenómeno, donde se observa cómo la actividad catalítica de tres proteasas, describen una disminución progresivamente de su actividad a medida que se aleja del rango óptimo de temperatura (40 - 50 °C).

**pH:** la actividad enzimática disminuye a medida que se aleja del pH óptimo de la enzima, tal como se observa en la figura 9B, donde la actividad residual de tres proteasas, disminuye a medida que se va alejando del pH 5 (próximo al óptimo), describiendo un efecto inversamente proporcional sobre la actividad, Morillo et al, (2015).



**Figura 5.** Efecto de la temperatura (A) y el pH (B) sobre la actividad enzimática de tres proteasas aspárticas, evaluadas en muestras de leche descremada a 37 °C.

**Concentración del sustrato:** su estado, grado de pureza y estabilidad son aspectos importantes de un sustrato. Para alcanzar máxima actividad enzimática, la concentración de sustrato debe ser a tal punto de que sature a la enzima, Hans (citado), como se muestra en la figura 6A; esto garantiza que todas las enzimas se adhieran al sustrato. Por encima de estos valores no tendrá efecto alguno sobre la velocidad de reacción. En la figura 6B, se muestra un diagrama general de la variación de la concentración de producto en función a la concentración de sustrato.



**Figura 6.** Representación gráfica de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato (A). Aparición de producto en función del tiempo (B). Donde  $V_{Max}$ , es la velocidad máxima de la reacción, S1, S2, S3 y S4 son las concentraciones de sustratos 1, 2, 3 y 4.

Concentración de enzima: en las reacciones enzimáticas donde se garantizan las condiciones óptimas (pH, temperatura, concentración de sustrato y ausencia de inhibidores), la actividad catalítica depende directamente de la concentración de la enzima, tal como ocurre en la determinación de la concentración de colesterol mediante el método enzimático, donde la máxima absorbancia se registra a concentraciones 400 - 500 U/L de la enzima colesterol esterasa, siendo este valor recomendado por las casas comerciales, Chaves – Chavarria et al, (1997).

Espectrofotometría: es una técnica de análisis basado en la capacidad de algunas sustancias de absorber la luz a determinada longitud de onda, Roca y Rodríguez (citado) y General Electric Company (2012). Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, es decir, una sustancia absorbe una cantidad de radiación diferente a la que absorbe otro compuesto. Este fenómeno permite establecer una relación entre la absorción de luz de un compuesto y su concentración. Desde el punto de vista de métodos analíticos, esta relación debe cumplir con la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * d * C \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde

**A:** es la absorbancia

**$\varepsilon$ :** es el coeficiente de extinción molar ( $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ )

**d:** es la distancia del paso óptico (cm)

**C:** es la concentración de la sustancia ( $\mu\text{mol/ml}$ )

El material de la cubeta es un factor que influye en las lecturas de absorbancia y pueden estar elaboradas de vidrio, plástico o cuarzo. Dependiendo del material, la cantidad de luz absorbida por la propia cubeta varía significativamente. Por ejemplo, para lecturas con longitudes de ondas por debajo de 310 nm se requieren de cubetas de cuarzo, debido a que las de plástico absorben por debajo de esa longitud de onda. Otro aspecto importante es la distancia del paso óptico y por lo general, las cubetas más utilizadas tienen una longitud de paso de la luz de un centímetro, Roca y Rodríguez (2003).

**Cálculo y expresión de resultados:** la expresión de los resultados en los ensayos enzimáticos involucra una serie de procedimientos matemáticos a partir del valor de absorbancia. En algunos casos se utiliza una curva de calibración, elaborada a partir de soluciones estándar y en un rango de concentraciones dentro del cual mantiene la linealidad en la relación absorbancia vs concentración del analito para cumplir con lo establecido por la Ley de Lambert-Beer. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Pérez-Espinoza, y Brambila (2005), determinaron que la curva de calibración elaborada a partir de valores de concentración de glucosa en solución y su absorbancia, es lineal hasta una concentración de 450 mg/dL, por encima de esta concentración se desvía de la relación lineal Pérez-Espinoza y Brambilla (citado).

El coeficiente de extinción molar ( $\varepsilon$ ), también llamado absortividad molar, es una propiedad de los compuestos que mide la capacidad de absorción de luz de las especies químicas a una determinada longitud de onda y es utilizada en el cálculo de concentraciones del analito o también en la estimación de la actividad enzimática. Estos coeficientes

se obtienen de la literatura determinados por métodos predictivos o son el resultado de determinaciones experimentales, Roca y Rodríguez (citado) y Morera (2018).

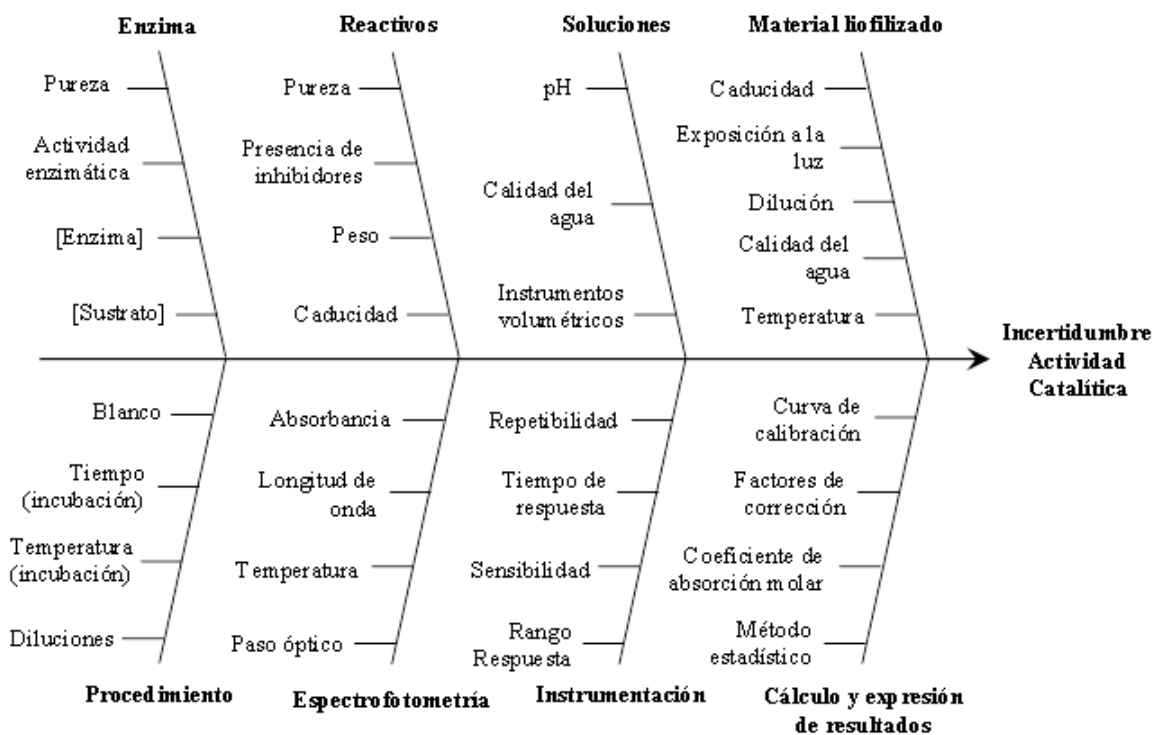
**Procedimiento:** la ejecución de la técnica involucra la medición de fracciones volumétricas por el orden de los microlitros, realizar diluciones seriadas tanto en la preparación de las muestras como en la curva de calibración, preparación de la mezcla de reacción para la lectura de la absorbancia. El tiempo de incubación de la mezcla de reacción en concordancia con los parámetros cinéticos de la enzima y sus condiciones de trabajo. Todos estos son aspectos que influyen en la lectura de la absorbancia y en consecuencia provoca una dispersión de los resultados.

**Reconstitución del material liofilizado:** las enzimas liofilizadas son más estables durante el almacenamiento, sin embargo, deben mantenerse resguardado de la luz y preferiblemente a bajas temperaturas. Al momento de utilizarlas deben ser reconstituidas en una disolución. Este paso es fundamental, y debe realizarse con precisión, debido a que cualquier inexactitud en el proceso incide sobre la reacción catalítica. En este paso también deben tomarse en cuenta la calidad del agua y la temperatura de la dilución, debido a que tienen efecto sobre la solubilidad del liofilizado.

**Instrumentación:** todos los equipos de medición deben estar calibrados, en el caso del espectrofotómetro, además de su calibración, es importante conocer el tiempo de respuesta, es decir, el tiempo que tarda desde que ocurre el paso de la luz a través de la muestra y la emisión de resultado (lectura), sobre todo si el ensayo involucra reacciones catalíticas que ocurren por el orden de los segundos.

**Reactivos y la preparación de las soluciones:** la calidad de los reactivos influye sobre la actividad catalítica de las enzimas. Deben estar certificados para uso analítico, asegurando la máxima pureza, tiempo de vigencia y libre de compuestos que puedan afectar la actividad catalítica. En el caso de los reactivos en polvo, la preparación de las soluciones debe ser debidamente pesada y disueltos en agua destilada, ultrapura o solución buffer según el caso. Al igual que la solución a partir de materiales liofilizados, los instrumentos volumétricos deben estar calibrados.

De acuerdo a lo analizado anteriormente, se presenta una representación gráfica de las principales fuentes de incertidumbre que afectan los métodos de ensayos enzimáticos apoyados en técnicas espectrofotométricas UV-Vis (figura 7).



**Figura 7.** Diagrama de causa y efecto de las principales fuentes de incertidumbre que afectan los métodos de ensayos enzimáticos apoyados en técnicas espectrofotométricas.

## CONCLUSIONES

La determinación del valor de un mesurando asociado a una actividad biológica, puede ser más compleja en comparación con una medición física o química debido a características del propio sistema y a la sensibilidad frente a las condiciones ambientales. En el caso particular de la medición de los microorganismos viables por el método de recuento en placas, los factores críticos para la exactitud de los resultados se centran principalmente en la capacidad del crecimiento de los microorganismos en condiciones del laboratorio y en la calidad de las muestras en evaluación,

Las fuentes de incertidumbre que afectan los métodos de ensayos enzimáticos apoyados en la técnica espectrofotometría UV-Vis, están relacionados principalmente con las características intrínsecas de las enzimas, de sus propiedades como catalizador biológico de reacciones específicas y de la precisión en la medición espectrofotométrica UV-Vis, por lo que la experiencia y pericia de los analistas juegan un papel importante, requiriendo de un profesional entrenamiento acorde a las exigencias del método y el cuidado en el tratamiento de las muestras

Las condiciones de las instalaciones del laboratorio también contribuyen a la exactitud en los resultados de la medición de los microorganismos viables por el método de recuento en placa y en los ensayos enzimáticos apoyados en la técnica espectrofotometría UV-Vis. Deben garantizar las condiciones ambientales acorde con las exigencias de cada método y a la naturaleza de las muestras a ser analizada, además de proveer las comodida-

des para el trabajo del analista.

## REFERENCIAS

- Cerra H., Fernández, M., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno G., y Zaranki, E. (2013). Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires, Argentina: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC).
- Chaves-Chavarría, A., Vargas-Umaña, M., Schosinsky-Neveermann, K., y Jiménez-Díaz, M. (1997). Evaluación de un método enzimático colorimétrico para la cuantificación de colesterol sérico. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-43.
- Dávila Fernández, N y Hernández García, J. (2006). Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria*, VII (7), 1-18.
- EURACHEM/CITAC (2012). *Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. UK: Tercera Edición Inglesa, Primera Edición Española.
- Frioni, L. (2005). *Microbiología: Básica, Ambiental y Agrícola*. Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay.
- G02 R00. (2017). *Guía. Aplicación de condiciones ambientales en los laboratorios clínicos*. Ecuador: Servicio de Acreditación Ecuatoriano.
- General Electric Company (2012). *Spectrophotometry. Handbook from GE Healthcare Life Sciences*. Buckinghamshire, UK.
- Guerrero Gómez, C., y Sánchez Carrillo, C. (2003). *Recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica Ecuador: Primera edición*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Gunar, O. V., & Sakhno N. G. (2015). Uncertainty of quantitative microbiological methods of pharmaceutical analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 496 (2), 1073-1076. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.022>.
- Hans Bisswanger (2014). *Enzyme assays. Perspectives in Science*, 1 (1-6), 41-55.
- Hozbor, D., y Lodeiro, A. R. (2017). Capítulo 6: Efectos del pH y la temperatura. En A. R. Loderiro (Ed). *Catálisis Enzimática. Fundamentos Químicos de la Vida* (pp. 137-147), Editorial de la Universidad de La Plata.
- ISO/IEC 17025:2017. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Ginebra, Suiza: Tercera edición.
- Junco Díaz, R., y Rodríguez Pérez C. M. (2001). Capítulo 7: Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En A. Llop, M. M. Váldez-Dapena & J.L. Zuazo (Eds). *Microbio-*

- Lyrio Traple, M., Saviano, A. M., Francisco, F.L., & Lourenço, F. R. (2014). Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4 (1), 1–5.
- Morera Córdova, V. (2018). Determinación del coeficiente de absortividad específico del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante. *Bionatura*, 3(4), 715–720. <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.04.5>
- Morillo Piña, O. T., García Lugo, P. J., Guerrero Cárdena, B. R., Torres Vielma, Y., & Castañeda Ruiz, R. F. (2015). Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVII (1), 54 – 60.
- Mühlhauser, P. M., & Rivas, J. L. (2014). Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25 (3), 569-579.
- Niño Camacho, L., y Torres Saenz, R. (2016). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas *Pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol. *Revista ION*, 23 (1), 41–46.
- Obando, S., Barrantes, M., y Hernández, F. (1999). Construcción y evaluación de una jarra económica para anaerobiosis. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 20 (3-4), 175-181.
- Pérez-Espinoza, M., y Brambila, E. (2005). Preparación y evaluación de un equipo de reactivos para la determinación de glucosa (glucosa oxidasa/peroxidasa). *Bioquímica*, 30 (4), 110–117.
- Rami L, & Canalias F. (2015). An approach to establish the uncertainty budget of catalytic activity concentration measurements in a reference laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53 (5), 743-751. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0579>.
- Rivera Intriago, L. (2015). *Microbiología. Interiorización del Conocimiento de Forma Significativa y Comprensiva*. Universidad Técnica de Machala, Ecuador: Ediciones UTMACH.
- Roca P., Oliver J., y Rodríguez, A. M. (2003). Capítulo 5: Técnicas Espectrofotométricas y fotométricas. En A. Irurzun y E. Feduchi (Eds). *Bioquímica. Técnicas y Métodos* (pp. 70 – 85). Editorial Helice.
- Rodríguez Vargas, M. (2016). Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Vocabulario Internacional de Metrología (2012). *Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)*. España: 3ª edición en español Centro Español de Metrología

Waites, M. J., Morgan, N. J., Rockey, J. S., & Higton, G. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. School of Applied Science, South Bank University, London, UK: Blackwell Science Editorial.

---

**Luishana Dudamell Graterol:** Ingeniero Químico y Mecánico, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Venezuela; Especialización profesional en Gestión de la Calidad ISO 9001:2015, Escuela Europea de Excelencia. Auditor Interno ISO 9001:2015, Escuela Europea de Excelencia, España y Audiconsult, Venezuela; Formación en ISO/IEC 17025:2017, Fundación Centro de Investigación del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE), Venezuela; Maestrante en Educación Abierta y a Distancia, Universidad Nacional Abierta (UNA), Venezuela. Fiscal e Inspector de la Oficina Estatal del Yaracuy del Servicio Desconcentrado de Normalización, Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos (SENCAMER), Venezuela. Docente Instructor de la Universidad Nacional Experimental de las Fuerzas Armadas (UNEFA), Venezuela, en las unidades curriculares: Biología, Microbiología de los Alimentos y Fundamentos de Matemática. Clasificada como Personal de Investigación PI-5-IV Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología (Mincyt), Venezuela, por su experiencia en las áreas de Metrología, Manejo de sustancias químicas y Biotecnología.

**Osmar Thomas Morillo Piña:** Ingeniero Químico, Universidad Nacional Experimental Politécnica (UNEXPO) “Antonio José de Sucre”, Venezuela; Doctor en Biotecnología de Microorganismos, Universidad de Los Andes (ULA), Venezuela; Formación en Biotecnología Alimentaria, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR), Venezuela, Maestrante en Educación Abierta y a Distancia, Universidad Nacional Abierta (UNA), Venezuela. Jefe de Investigación, Reciclajes Industriales. (Armony Sustentable), Chile: línea de investigación “Desarrollo de bioproductos para la agricultura sustentable y el medio ambiente”. Profesor invitado, Postgrado de Biotecnología de Microorganismo, ULA, Venezuela: Línea de investigación “Proteasas con actividad coagulante de leche”.