

Etanol, método UV

Número de Catálogo	Apresentação
AK00061	60 testes (manual) / 600 testes (microplaca)

Aplicação

Este kit baseia-se num método enzimático rápido e simples para a determinação do etanol em géneros alimentícios, tais como as bebidas alcoólicas e não-alcoólicas, pão, produtos lácteos, fruta e vegetais, bem como em produtos cosméticos, farmacêuticos e produtos biológicos.

Introdução

O etanol é ubiqüitário na natureza. Ele é o produto final da fermentação alcoólica e um composto chave das bebidas alcoólicas, muito embora constitua um componente indesejável das bebidas não-alcoólicas e de baixo teor alcoólico. A presença de etanol em produtos com fruta, e.g. sumo de fruta, indica que os componentes usados na sua produção se podem ter decomposto. A presença de etanol é também um indicador indireto da presença de leveduras. Muitos outros produtos contêm também quantidades significativas de etanol, como por exemplo produtos cosméticos e farmacêuticos.

Princípio



A quantidade de NADH formado através da acção combinada da álcool desidrogenase (ADH) e da aldeído desidrogenase (AIDH), determinada a 340 nm, é o dobro da quantidade de etanol no volume de amostra.

Especificidade

Esta determinação é relativamente específica para o etanol, uma vez que o teor de n-propanol e de n-butanol, os quais também reagem com esta reacção, é tão pequena que pode ser negligenciada. O metanol, aldeídos, cetonas, alcoóis secundários e terciários, e o glicerol não interferem com esta determinação.

Sensibilidade e limite de deteção

A sensibilidade do ensaio é baseada em 0,005 UA e num volume de amostra de 2,00 mL. Este valor corresponde a uma concentração de etanol de 0,023 mg/L solução de amostra, quando determinada a 340 nm. O limite de detecção de 0,093 mg/L é derivado de uma diferença de absorvência de 0,020 (340 nm) para um volume máximo de amostra de 2,00 mL.

Linearidade e precisão

A determinação é linear entre 0,25 e 12 µg de etanol por ensaio (v = 2,00 mL). Num ensaio duplo de uma determinada amostra, pode ocorrer uma diferença de 0,005 a 0,010 UA (0,023-0,046 mg/L de etanol, v = 2,00 mL). O CV é aproximadamente 1 a 3% dentro do intervalo de linearidade.

Composição do kit

Solução 1. Tampão de pirofosfato de potássio (15 mL, 1,5 M, pH 9,0) e azida de sódio (0,02% w/v) como conservante. Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Solução 2. NAD⁺ (155 mg). Armazenar entre 2 °C e 8 °C (armazenamento prolongado: -30 °C a -15 °C)

Dissolver em 12,4 mL de água destilada, dividir em aliquotas de tamanho apropriado, armazenar em tubos de PP, de -30 °C a -15 °C, entre utilizações e manter frio durante o uso.

Suspensão 3. Aldeído desidrogenase (AIDH, EC 1.2.1.3) em 3,2 M de sulfato de amónio (1,3 mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Suspensão 4. Álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1) em 3,2 M de sulfato de amónio (1,3 mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Solução 5. Solução padrão de etanol (5 mL, 5,0 mg/mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Diluir 0,5 mL para 50 mL com água destilada; armazenar num frasco bem fechado e usar dentro de 2 dias a 2 °C e 8 °C. Este padrão deve ser usado quando existirem dúvidas sobre a exatidão do método.

Protocolo (análise a ponto final)

Comprimento de onda: 340 nm

Cuvete: 1 cm meio óptico (vidro ou plástico com tampa)

Temperatura: ~20-25 °C

Volume final: 2,54 mL

Solução de amostra: 0,25-12 µg de etanol por cuvete (em 0,10-2,00 mL volume de amostra)

Ler contra o ar (sem cuvete no meio óptico) ou contra água

PIPETAR PARA CUVETES (mL)	BRANCO	AMOSTRA
Água destilada (~25 °C)	2,10	2,00
Amostra	-	0,10
Solução 1 (tampão PPI)	0,20	0,20
Solução 2 (NAD ⁺)	0,20	0,20
Suspensão 3 (ADH)	0,02	0,02
Agitar, determinar a absorvência das soluções (A1) após ~2 min e iniciar a reacção através da adição da		
Suspensão 4 (ADH)	0,02	0,02
Agitar, determinar a absorvência das soluções (A2) no final da reacção (aproximadamente 5 min)*		

Misturar por inversão suave após tapar a cuvete com a tampa ou Parafilm®.

* se necessário, continuar a ler as absorvências em intervalos de 2 min até ao final da reacção.

Cálculos

Determinar a diferença de absorvências para os ensaios em branco e da amostra (A2-A1). Subtrair a diferença de absorvência do branco da diferença de absorvência da amostra, obtendo assim ΔA_{Etanol} . A concentração de etanol, baseada na ϵ do NADH a 340 nm ($6300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), é calculada da seguinte forma:

$$C (\text{Etanol}) = 0.09287 \times \Delta A_{\text{Etanol}} \quad [\text{g/L}]$$

$$C (\text{Etanol}) = 0.01176 \times \Delta A_{\text{Etanol}} \quad [\%v/v]$$

Se a amostra foi diluída ou se foi utilizado um volume de amostra diferente no ensaio, o resultado deve ser multiplicado pelo correspondente factor de diluição/concentração.

Procedimentos alternativos (micro-volumes)

Muito embora este kit tenha sido desenvolvido para cuvetes, ele pode ser facilmente adaptado a microplacas de 96 poços e auto-analisadores. Basicamente, os volumes de ensaio do formato cuvete deve ser reduzido aproximadamente 10 vezes para se adaptar aos formatos de microplaca ou de auto-analisador. No entanto, ao usar estes formatos de micro-volume deve ter-se presente que a espessura do meio óptico é geralmente inferior a 1 cm, que é o valor padrão do meio óptico das cuvetes. Deste modo, para calcular a quantidade de analito na amostra deve seguir-se uma das três estratégias descritas na "Alternative Procedures", o qual se encontra disponível no website da NZYtech.

Interferências

A água destilada, os tampões e o ar dos laboratórios podem encontrar-se contaminados com etanol, o que pode originar valores superiores do ensaio em branco ou reacções creep. Deste modo, é necessário tapar as cuvetes durante o ensaio. Eventualmente, para amostras incolores, a reacção pode ser iniciada com a adição da amostra. Se o etanol foi completamente convertido dentro do tempo especificado (aprox. 5 min), pode-se concluir geralmente que não ocorreu nenhuma interferência. A existência de substâncias interferentes na amostra pode ser detectada pela utilização de um padrão interno. Neste caso, deve ser obtida a recuperação quantitativa deste padrão. As perdas devidas ao manuseamento

e à extracção da amostra são identificadas pela realização de ensaios de recuperação, os quais se realizam pela adição de etanol à amostra nos passos iniciais do processo extractivo.

Informação geral sobre a preparação das amostras

A quantidade de etanol presente na cuvete deve variar entre 0,25 e 12 µg. Deste modo, o volume de amostra (0,10 mL) deve apresentar uma concentração de etanol entre 2,5 e 120 mg/L, devendo ser diluído, caso seja necessário. No entanto, o volume de amostra pode variar entre 0,10 e 2,00 mL, usando água destilada para o efeito (concentração do analito entre 0,12 e 120 mg/L).

Devem ser tomados cuidados especiais para evitar a contaminação com outras fontes de etanol ou a sua perda por evaporação. Para o efeito, todas as operações devem ser realizadas em frascos de vidro selados de modo a evitar a sua volatilização. Deve ser dada uma atenção particular à pipetagem, diluição e filtração das soluções. As pontas plásticas das pipetas a utilizar devem ser lavadas 3 vezes com a solução antes de se pipetar a alíquota. As cuvetes e as pontas plásticas devem ser lavadas 3 vezes com água destilada isenta de etanol e secas antes de serem usadas. Não utilizar a pipeta usada para alíquotar o padrão de etanol, ou outra solução contendo etanol, na realização dos ensaios.

Para implementar este ensaio use diretamente, ou após diluição, amostras líquidas lípidas, descoradas e com pH próximo da neutralidade; filtrar as soluções turvas, desgaseificar as amostras contendo dióxido de carbono (e.g. por filtração; ajustar o pH das amostras ácidas, que não sejam diluídas no ensaio, a 8 – 9 pela adição de solução de hidróxido de sódio ou potássio; ajustar amostras fracamente coradas ao pH 8 – 9 e incubar durante aproximadamente 15 min; medir as amostras “coradas” (se necessário, com pH ajustado a 8 – 9) contra um ensaio em branco de amostra; tratar as amostras “fortemente coradas” que não forem diluídas ou com um volume de amostra superior com PVPP; esmagar ou homogeneizar amostras sólidas ou semi-sólidas, extraí-las com água ou dissolvê-las; extrair amostras com gordura com água quente.

Exemplos de preparação das amostras

Determinação do etanol nos vinhos branco e tinto

A concentração de etanol nos vinhos branco e tinto pode ser determinada sem qualquer tratamento prévio das amostras. Deste modo, para vinhos com 10-15 % v/v de etanol, uma diluição da amostra de 1:1000 e um volume de amostra de 0,1 mL são geralmente adequados.

Determinação do etanol nos produtos lácteos

Pesar com precisão aproximadamente 10 g de amostra num frasco de 100 mL e proceda à sua extração com 50 mL de água isenta de etanol, sob agitação, durante 30 min a 60 °C (manter o frasco fechado). Após deixar arrefecer, transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 100 mL. Ajustar o volume até ao traço com água isenta de etanol. Se necessário, filtrar e diluir as soluções turvas. De um modo geral, não é necessário qualquer diluição e volumes de amostra até 0,5 mL são adequados.

Determinação do etanol em alimentos sólidos

Os alimentos sólidos (~10 g) devem ser homogeneizados, se necessário, com um homogeneizador ou mortar. Para o efeito, adicionar 50 mL de água isenta de etanol a 2 g de amostra, e agitar durante 30 min num frasco fechado (se necessário, aquecer a 60 °C). Arrefecer o extrato, se necessário, e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Diluir até ao traço do balão com água isenta de etanol. Filtrar a solução turva, diluir se necessário e analisar. Em geral, uma diluição de 1:10 e um volume de amostra de 0,1 mL são adequados.

Referências

Beutler, H. O. (1988). Ethanol. In: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VI, pp. 598-606, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

Recomendações

Este método é recomendado/aprovado por:

- Legislação alimentar Austríaca, Belga, Alemã e Suíça;
- Padrão Francês (NF);
- International Federation of Fruit Juice Producers (IFU);
- Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.);
- European Brewery Convention (EBC);
- American Society of Brewing Chemists (ASBC);

Contacte info@nzytech.com para obter qualquer informação adicional sobre este kit, incluindo outras aplicações específicas.

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.