

Ácido Acético, método UV

Número de Catálogo **Apresentação**
AK00081 53 testes

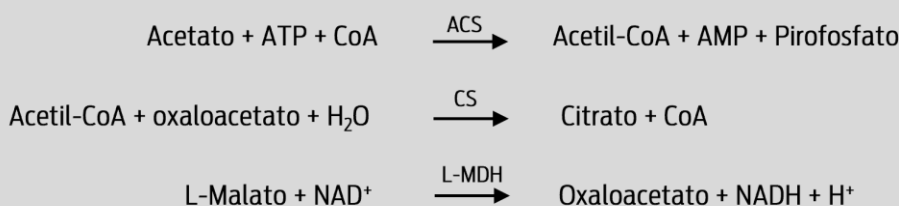
Aplicação

Este kit é indicado para a determinação do ácido acético (acetato) em alimentos, tais como o vinho, a cerveja, o vinagre, os produtos lácteos, o pão, o peixe, a carne, os vegetais, a fruta e o sumo de fruta, bem como na indústria do papel, em alimentação animal (silagens), em produtos farmacêuticos e amostras biológicas. O seu fundamento baseia-se num método enzimático, rápido, simples e específico para o analito em causa.

Introdução

O ácido acético é um metabolito muito importante uma vez que é o produto final de processos fermentativos e da oxidação do acetaldeído e do etanol. O ácido acético é o principal componente dos "ácidos voláteis" do vinho e um dos parâmetros mais importantes para avaliação do seu controlo de qualidade. Uma concentração elevada de ácido acético no vinho resulta da degradação do mesmo. Deste modo, existem limites legais para a concentração de ácido acético no vinho. Para além disso, o ácido acético é usado na produção alimentar como conservante e intensificador de sabor. Por último, o ácido acético é o composto que determina o valor económico do vinagre.

Princípio



A quantidade de NADH resultante da ação combinada da acetil-CoA sintetase (ACS), citrato sintase (CS) e L-malato desidrogenase (L-MDH) é medida a 340 nm. Dado que as reações prévias se encontram em equilíbrio, a quantidade de acetato existente na amostra deve ser calculada com recurso à equação da página 2.

Especificidade

Este método é específico para a determinação do ácido acético.

Sensibilidade e limite de deteção

A sensibilidade do ensaio é de 0,005 AU num volume de amostra de 2,00 mL. Este valor corresponde a uma concentração de ácido acético de 0,07 mg/L de amostra quando medida a 340 nm. O limite de deteção de 0,14 mg/L resulta de uma diferença de absorvência de 0,010 (340 nm) para um volume de amostra máximo de 2,00 mL.

Linearidade e precisão

A determinação apresenta linearidade entre 0,3 e 20 µg de ácido acético por ensaio. Num duplicado da mesma amostra, uma diferença de 0,005 a 0,010 unidades de absorvência pode ocorrer. Para um volume de amostra de 0,10 mL, esta diferença corresponde a uma concentração de ácido acético de aprox. 0,07 a 0,14 mg/L de solução de amostra. O desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação, é de aproximadamente 1 a 3%.

Composição do kit

Solução 1. Tampão TEA (30 mL, 0,8 M, pH 8,4), ácido L-málico (60 mM), MgCl₂ (20 mM) e azida de sódio (0,02% w/v) como conservante. Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Solução 2 (x2). NAD⁺ (67 mg), ATP (137 mg), PVP (30 mg) e CoA (9.8 mg). Armazenar entre 2 °C e 8 °C (armazenamento prolongado: -30 °C a -15 °C)

Dissolver em 5,5 mL de água destilada, dividir em alíquotas de volume adequado e armazenar em tubos de PP a 30 °C a -15 °C entre utilizações (estável durante 2 anos); manter frio durante a utilização. O conteúdo do segundo frasco deve ser dissolvido apenas quando necessário.

Suspensão 3. L-Malato desidrogenase (L-MDH) e citrato sintase (CS) em 3,2 M de sulfato de amónio (1,1 mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Suspensão 4. Acetil-CoA sintetase (ACS) em 3,2 M de sulfato de amónio (1,1 mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Solução 5. Solução padrão de ácido acético (5 mL, 0,10 mg/mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C. Esta solução padrão pode ser utilizada quando existirem dúvidas sobre a exatidão do método ($\epsilon_{\text{NADH},340 \text{ nm}} = 6300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Protocolo (análise a ponto final)

Comprimento de onda: 340 nm

Cuvete: 1 cm meio ótico (vidro ou plástico)

Temperatura: ~25 °C

Volume final: 2,84 mL

Amostra: 0,5-20 µg de ácido acético por cuvete (num volume de 0,10-2,00 mL)

Ler as absorvências contra o ar (sem cuvete no percurso ótico) ou contra a água

PIPETAR PARA CUVETES (mL)	BRANCO	AMOSTRA
Água destilada (~25 °C)	2,10 mL	2,00 mL
Amostra (entre 0,10 e 2,00 mL)	-	0,10 mL
Solução 1 (tampão TEA)	0,50 mL	0,50 mL
Solução 2 (NAD ⁺ +ATP+CoA+PVP)	0,20 mL	0,20 mL
Misturar, medir a absorvência das soluções acima (A0) após aprox. 3 min e iniciar a reação através da adição de		
Suspensão 3 (L-MDH/CS)	0,02 mL	0,02 mL
Misturar, medir a absorvência das soluções (A1) após ~4 min e iniciar a reação através da adição de		
Suspensão 4 (ACS)	0,02 mL	0,02 mL
Misturar e medir a absorvência das soluções (A2) no final da reação (aprox. 12 min). Se a reação não tiver parado ao fim dos 12 min, continuar a medir as absorvências até aos 20 min (em intervalos de 4 min). Usar o ficheiro <i>NZYKit Calculator</i> para descontar o "creep rate".		

Homogeneizar com uma espátula plástica ou por inversão cuidadosa após vedar a cuvete com a tampa ou Parafilm®

Cálculos

Usar o ficheiro *NZYKit Calculator* para facilitar os cálculos, o qual pode ser obtido a partir da informação adicional do produto no sítio de internet da NZYtech (www.nzytech.com). Caso existam reações "creep" (aumento ligeiro da absorvência da amostra (A2) após a reação rápida inicial), considerar a velocidade linear para obter o valor de A2 corrigido. Ler as absorvências aos 16 e 20 minutos e usar o ficheiro *NZYKit Calculator*.

Se não usar o ficheiro *NZYKit Calculator*, determinar as diferenças de absorvência entre o branco e a amostra (A1-A0 e A2-A0). Dado que não existe uma relação linear entre a diferença de absorvências medida e a concentração de ácido acético, o valor de $\Delta A_{\text{Ácido acético}}$ deve ser calculado usando a seguinte equação:

$$\Delta A_{\text{Ácido acético}} = [(A2-A0)_{\text{amostra}} - \frac{(A1-A0)_{\text{amostra}}^2}{(A2-A0)_{\text{amostra}}}] - [(A2-A0)_{\text{branco}} - \frac{(A1-A0)_{\text{branco}}^2}{(A2-A0)_{\text{branco}}}]$$

A concentração de ácido acético, baseada no ϵ do NADH a 340 nm ($6300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), é calculada da seguinte forma:

$$C (\text{Ácido acético}) = 0.2707 \times \Delta A_{\text{Ácido acético}} \quad [\text{g/L}]$$

Caso a amostra tenha sido diluída ou um volume de amostra diferente tenha sido usado, o resultado final deve ser calculado pela multiplicação do valor obtido pelo correspondente fator de diluição/concentração.

Procedimentos alternativos (micro-volumes)

Apesar do kit ter sido desenvolvido para uso em cuvete, o mesmo pode ser facilmente adaptado para o uso em microplacas de 96 poços ou em autoanalisadores. Basicamente, os volumes de ensaio do presente protocolo (formato cuvete) devem ser reduzidos cerca de 10 vezes para adaptação ao formato microplaca ou autoanalisador. No entanto, na utilização destes formatos de micro-volume deve ter-se em atenção que a espessura do meio ótico é geralmente inferior à espessura do meio ótico de referência (1 cm). Deste modo, para calcular o teor de analito nas amostras deve seguir uma das três estratégias possíveis descritas em "Alternative Procedures Brochure", disponível em www.nzytech.com.

Interferências

Os ésteres de ácido acético hidrolisam lentamente nestas condições de reação. O ácido acético formado é responsável pelas "creep reactions" nos ensaios das amostras. Este efeito pode ser eliminado pela extrapolação do valor A2 ao momento da adição da suspensão 4 (ACS).

Tal como foi referido anteriormente, esta correção pode ser facilmente conseguida através da leitura dos valores adicionais de absorvência aos 16 e 20 minutos e da utilização do ficheiro *NZYKit Calculator*. O valor de A2 corrigido permite obter a concentração de ácido acético. No entanto, a conversão completa do ácido acético dentro do tempo especificado para o ensaio (aprox. 10-12 min) indica, em geral, que não ocorreram interferências. A concentração total de ácido acético, nas formas livre e esterificada, pode ser determinada deixando a reação atingir o ponto final (até o valor de absorvência ficar estável).

Informação geral sobre a preparação das amostras

A quantidade total de ácido acético na cuvete deve situar-se entre 0,3 e 20 µg. Deste modo, se se usar um volume de amostra de 0,10 mL, a amostra deve ser diluída para concentrações de ácido acético entre 3 e 200 mg/L. No entanto, o volume de amostra pode variar entre 0,10 e 2,00 mL, através da substituição da água (analitos variam entre 0,15 e 200 mg/L).

Para realizar este ensaio, use amostras líquidas transparentes e praticamente neutras, diretamente ou após diluição das mesmas; filtrar as soluções turvas; desgaseificar as amostras que contenham dióxido de carbono (e.g. filtração); ajustar o pH das amostras a pH 8-9 através da adição de solução de hidróxido de sódio ou potássio; ajustar amostras ácidas e ligeiramente coradas a pH 8-9 e incubar aproximadamente 15 minutos; medir as amostras "coradas" (se necessário ajustadas a pH 8-9) contra o ensaio em branco; tratar as amostras "fortemente coradas" que forem usadas não diluídas ou com um volume de amostra elevado com PVPP; esmagar ou homogeneizar as amostras sólidas ou semi-sólidas, e extrair com água ou dissolvê-las; extrair as amostras com teores elevados de gordura com água quente.

Exemplos de preparação das amostras

Determinação do ácido acético nos vinhos tinto e branco

Para o vinho branco, usar 0,10 mL no ensaio. Para amostras com baixas concentrações de ácido acético, podem ser usados volumes até 2,0 mL. Para vinhos tintos contendo aprox. 0,2 g de ácido acético/L, usar 0,10 mL de amostra sem decorar no ensaio. Para vinhos tintos com menos do que 0,1 g de ácido acético/L, as amostras devem ser decaradas com a adição de 0,2 g de PVPP por cada 10 mL de amostra e com 5 min de agitação. Filtrar uma alíquota com papel de filtro Whatman nº 1 e ajustar o pH a aprox. 8,4. Ajustar o volume a duas vezes o volume original da amostra usada. Um volume de amostra até 2,0 mL pode ser usado e esse volume deve ser levado em consideração nos cálculos. Quando forem usados grandes volumes de amostra, as concentrações elevadas de álcool podem inibir as atividades catalíticas usadas na quantificação do acetato. Nestes casos, aumenatr o tempo de incubação até aos 20 min e ler valores subsequentes de absorvência para confirmar que a reação parou. Usualmente, uma diluição de 1:5 e um volume de amostra de 0,1 mL são satisfatórios.

Determinação do ácido acético nos sumos de fruta

Nos sumos de fruta com uma concentração elevada de ácido acético (aprox. 0,3 g/L), diluir uma amostra com um volume igual de água e usar 0,1 mL no ensaio. Caso seja necessário usar um volume grande de amostra, ajustar o pH a aprox. 8,4 antes da análise. As amostras de sumos corados devem ser decaradas tal como indicado acima. Usar de 0,10 a 2,00 mL de amostra no ensaio. Usualmente, não é necessária diluição e um volume de amostra de 0,1 mL é satisfatório.

Determinação do ácido acético na cerveja

Desgaseificar a amostra de cerveja por filtração ou por agitação com uma vareta de vidro. Usualmente, não é necessário diluir a amostra e um volume de amostra de 0,2 mL é satisfatório.

Determinação do ácido acético no vinagre

Diluir a amostra de modo a que a sua concentração de analito se situe no intervalo descrito na informação geral sobre preparação de amostras. De um modo geral, uma diluição de 1:500 e um volume de amostra de 0,1 mL são adequados.

Referências

Beutler, H.O. (1984). Acetic acid. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 639-645, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.

AOAC Official Methods of Analysis (2002). 17th ed., Chapter 32, pp. 47-48.

Recomendações

Este método é recomendado/aprovado por:

- Padrões Europeus, Alemão e Internacionais (EN, DIN, ISO);
- Recomendado pela International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) e pela Central European Commission for Brewing Technology.

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.

NZYtech Lda. Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com