

# Megazyme

---

## ACETALDEHÍDO

### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-ACHYD 11/05

(50 Ensayos por Kit)

*Este folleto se puede conseguir en*  
**[www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)** en los siguientes idiomas:  
**Inglés-Francés-Alemán-Italiano-Portugués**

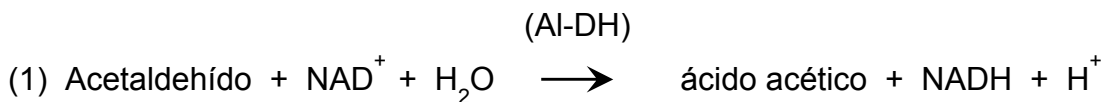


## INTRODUCCIÓN:

El acetaldehído se genera en muchos procesos metabólicos y por tanto se produce en todos los organismos vivos<sup>1</sup>. Cuando los procesos de fermentación desempeñan una función en la producción de alimentos y bebidas, la concentración de acetaldehído aumenta de forma considerable. Se ha encontrado acetaldehído en el vino, en concentraciones de hasta 100 mg/L y en la cerveza hasta 20 mg/L. El acetaldehído en la sangre humana se origina del etanol que se ha ingerido en comidas y bebidas. El consumo excesivo de etanol puede provocar un envenenamiento por acetaldehído después de una oxidación del etanol en el hígado por el alcohol deshidrogenasa.

## PRINCIPIO:

El acetaldehído se oxida cuantitativamente en ácido acético en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH) y nicotinamida-adenina dinucleotido (NAD<sup>+</sup>) (1).



La cantidad de NADH que se forma en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de acetaldehído. Lo que se mide es el NADH, por el aumento de la capacidad de absorción a 340 nm.

## ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:

Al-DH actúa sobre otros aldehídos distintos al acetaldehído pero a un porcentaje reducido. En las condiciones del ensayo descritas, el acetaldehído y el propionaldehído se convierten cuantitativamente en glicolaldehído si el tiempo de reacción es superior ~ 20 min. La presencia de benzaldehído y gliceraldehído puede dar como resultado reacciones de fluencia lenta dependientes de la muestra, que pueden justificar la extrapolación al momento en que se añadió Al-DH.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,005 unidades. Esto corresponde a 0,044 mg/L de solución de muestra a un volumen máximo de muestra de 2 mL. El límite de detección es de 0,176 mg/L, que se deriva de un diferencial de absorción de 0,020 con un volumen máximo de muestra de 2 mL.

El ensayo es lineal a lo largo del intervalo de 0,5 a 20 µg de acetaldehído por ensayo. En determinaciones dobles utilizando una solución de muestra, se puede producir una diferencia de absorción de 0,005 a 0.010. Con un volumen de muestra de 2 mL, esto corresponde a una concentración de acetaldehído de aproximadamente entre 0,044 y 0,088 mg/L de solución de muestra. Si la muestra se diluye durante su preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución, F. Si

en la preparación de la muestra, la muestra se pesa, por ejemplo, 10 g/L, cabe esperar una diferencia entre 0,02 a 0,05 g/100 g.

### **INTERFERENCIA:**

Los compuestos en extractos animales no interfieren en el ensayo. Sin embargo, los polifenólicos de los materiales de las plantas pueden reducir la velocidad de la reacción.

Los alcoholes interfieren en el ensayo solo cuando están presentes en muy altas concentraciones. La reducción de sustancias tales como el ácido ascórbico y el anhídrido sulfuroso, no afectan al ensayo.

Si la conversión del acetaldehído se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo (aprox. 3-4 minutos min), en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo acetaldehído (aprox. 5 µg en 0,1 mL) en la cubeta, cuando se complete la reacción. Se debería observar un aumento significativo de la absorción.

Las sustancias que interfieren en la muestra analizadas se pueden identificar incluyendo un estándar interno. Cabe esperar una recuperación cuantitativa de este estándar. Las pérdidas en la manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo glicerol a la muestra en las fases iniciales de la extracción.

### **SEGURIDAD:**

En general, los reagentes utilizados en la determinación del acetaldehído no son materiales peligrosos según el Reglamento de Sustancias Peligrosas. Sin embargo, el concentrado tampón contiene azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante. Es necesario observar todas las medidas generales de seguridad que se aplican a todas las sustancias químicas. Las muestras que contienen altas concentraciones de acetaldehído se deben manipular en una campana con buena ventilación.

El trimero del aldehído acético de amoniaco que se entrega como material de control es un irritante de la piel e inflamable [Merck Index 10ª Edición (1983) página 30]. Cuando manipule materiales sólidos, póngase guantes de seguridad y gafas de protección y evite cualquier contacto con la piel. En caso de contacto con la piel, lávese bien con agua.

## KITS:

Megazyme dispone de kits idóneos para realizar 50 determinaciones. Los kits contienen el método completo de ensayo además de:

- Botella 1:** Tampón de pirofosfato de potasio (12 mL, 1,5 M, pH 9,0) más azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante.  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 2:** NAD<sup>+</sup> (138 mg).  
Estable durante > 5 años a -20°C.
- Botella 3:** Suspensión de aldehído deshidrogenasa (1,1 mL, 15 U/mL).  
Estable durante > 2 años a -20°C.
- Botella 4:** Polvo de control de acetaldehído. Trímero de acetaldehído de amoniaco (~ 2 g).  
Estable en un contenedor bien sellado (según se suministra) durante > 2 años a 4°C.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES/SUSPENSIONES DE REAGENTES:

1. Use el contenido de la botella 1 según se suministra. Estable durante > 2 años a 4°C.
2. Disuelva el contenido de la botella 2 en 11,0 mL de agua destilada. Divídala en partes alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas en tubos de polipropileno a -20°C entre uso y uso y mantégalos frescos durante su uso. Una vez disuelto, el reagente es estable durante > 2 años a -20°C.
3. Use el contenido de la botella 3 según se suministra. Antes de abrir por primera vez, agite la botella para eliminar cualquier enzima que se haya quedado en el tapón de goma. A continuación, guarde las botellas en posición vertical. **Agite la botella para que se mezcle su contenido antes de utilizarlo.**  
Estable durante > 2 años a -20°C.
4. Disuelva aproximadamente 80 mg de trímero de acetaldehído de amoniaco (que corresponde aproximadamente a 50 mg de acetaldehído) en 1 L de agua destilada. Guárdelo en una botella Duran<sup>®</sup> bien sellada y utilícelo en el día de la preparación (véase nota de seguridad en la página 2).

**NOTA:** La solución estándar de acetaldehído solo se utiliza en el ensayo cuando existe alguna duda sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que las sustancias que intervienen en la muestra están produciendo una inhibición. La concentración de glicerol se determina directamente a partir del coeficiente de extinción de NADH (véase página 6).

### **EQUIPO (RECOMENDADO):**

1. Matraces (50 mL y 100 mL).
2. Cubetas de plástico desechables (paso de luz de 1 cm, 3,0 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman<sup>®</sup> (20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L).
4. Pipeta de desplazamiento positivo p.ej. Eppendorf Multipette<sup>®</sup>
  - con 5 mL de Combitip<sup>®</sup> (para administrar partes alícuotas de 0,2 mL de tampón de pirofosfato y solución NAD<sup>+</sup>).
  - con 25 mL de Combitip<sup>®</sup> (para administrar partes alícuotas de 2 mL de agua destilada).
5. Balanza de precisión.
6. Espectrofotómetro a 340 nm.
7. Agitador vibrador de tubos Vortex (p.ej. Agitador de tubos de prueba IKA<sup>®</sup> Yellowline TTS2).
8. Cronómetro.
9. Papel filtro Whatman No. 1 (9 cm).

## PROCEDIMIENTO:

**Longitud de onda:** 340 nm  
**Cubeta:** Paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)

**NOTA:** Es esencial tapar las cubetas

**Temperatura:** ~ 25°C

**Volumen final:** 2,52 mL

**Solución de muestra:** 0,5-20 µg de acetaldehído por cubeta  
(en 0,10-2,00 mL de volumen de muestra)

**Medir contra corriente de aire** (sin cubeta en el paso de luz) o contra agua

Pipeta en cubetas	Muestra sin tratar	Muestra
agua destilada (~ 25°C)	2,10 mL	2,00 mL
solución de muestra	-	0,10 mL
solución 1 (tampón de pirofosfato)	0,20 mL	0,20 mL
solución 2 (NAD <sup>+</sup> )	0,20 mL	0,20 mL
Mezcle*, lea la absorción de las soluciones (A <sub>1</sub> ) transcurridos aproximadamente 2 min e inicie las reacciones añadiendo:		
suspensión 3 (Al-DH)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcle*, lea las absorciones de las soluciones (A <sub>2</sub> ) al final de la reacción (aprox. 3-4 min). Si la reacción no se ha detenido transcurridos 5 min, continúe leyendo las absorciones a intervalos de 2 min hasta que no cambien durante 2 min**.		

\* por ejemplo con una espátula de plástico o dándole la vuelta con cuidado después de tapar la cubeta con tapa o Parafilm<sup>®</sup>.

\*\* si este porcentaje de fluencia lenta es superior con muestra que sin muestra, extrapole las absorciones al momento en que ha añadido la suspensión 3 (utilizando **Mega-Calc<sup>™</sup>**).

## CALCULO:

Calcule las diferencias de absorción (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) con muestra y muestra sin tratar. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello ΔA<sub>acetaldehído</sub>. El valor de ΔA<sub>acetaldehído</sub> por regla general deberá ser de al menos 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

La concentración de acetaldehído se puede calcular de la siguiente forma:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{acetaldehído}} \quad [\text{g/L}]$$

**Donde:**

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular de acetaldehído [g/mol]

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción de NADH a 340 nm  
= 6300 [l x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

**Sigue para el acetaldehído:**

$$c = \frac{2,52 \times 44,05}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{\text{acetaldehído}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,1762 \times \Delta A_{\text{acetaldehído}} \quad [\text{g/L}]$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado se debe multiplicar por el factor de dilución, F.

Cuando se analicen muestras sólidas o semi-sólidas que se pesan para preparar la muestra, el contenido (g/100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente forma:

**Contenido de acetaldehído**

$$= \frac{C_{\text{acetaldehído}} [\text{g/L solución de muestra}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/L solución de muestra}]} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

**NOTA:** Estos cálculos se pueden simplificar utilizando la aplicación **Mega-Calc**<sup>TM</sup> de Megazyme, que se puede descargar desde la página web donde aparece el producto ([www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)).

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

### 1. Dilución de la muestra.

La cantidad de acetaldehído presente en la cubeta (es decir, en los 0,1 mL de muestra que se está analizando) deberá situarse entre 0,5 y 20 µg. La solución de muestra por tanto se debe diluir lo suficiente como para conseguir una concentración de acetaldehído entre 0,005 y 0,20 g/L.

**Tabla De la Dilución**

Concentración estimada de ácido acético (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución (F)
< 0,20	No es necesaria dilución	1
0,20-2,00	1 + 9	10
2,00-20,00	1 + 99	100
20,0-200	1 + 999	1000
> 200	1 + 9999	10000

Si el valor de  $\Delta A_{\text{acetaldehído}}$  es demasiado bajo (p.ej. < 0,100), pese más muestra o diluya con menos fuerza. Como alternativa, la muestra que se debe verter en la cubeta se puede aumentar a 2 mL, asegurándose de que los componentes de la muestra y el agua destilada en la reacción sumen 2,10 mL, utilizando el nuevo volumen de muestra en la ecuación.

### 2. Manipulación de la muestra.

**(a)** El acetaldehído es extremadamente volátil (punto de ebullición ~ 20°C), por lo que todas las muestras y controles del ensayo se deben guardar en contenedores bien tapados.

**(b)** Las soluciones que contengan acetaldehído deberían administrarse con el tampón o soluciones acuosas, para reducir al mínimo la pérdida por evaporación.

**(c)** El acetaldehído se oxida rápidamente por el oxígeno de la atmósfera. En consecuencia, es fundamental analizar las muestras tan pronto sea posible después de la preparación. Las soluciones de control se deben utilizar el día de la preparación.

**(d)** El material de ensayo que se debe utilizar es el trímero de acetaldehído de amoníaco, ya que es menos volátil y no se oxida o polimeriza tan pronto.



### 3. Clarificación de la muestra.

#### a. Soluciones:

**Solución Carrez.** Disuelva 3,60 g de hexacianoferrato de potasio (II)  $\{K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$  (Sigma cat. no. P-9387) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

**Solución Carrez II.** Disuelva 7,20 g de sulfato de cinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Sigma cat. no. Z-4750) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

**Hidróxido sódico (NaOH, 100 mM).** Disuelva 4 g de NaOH en 1 L de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

#### b. Procedimiento:

Vierta la muestra líquida en un matraz aforado de 100 mL que contenga aproximadamente 60 mL de agua destilada, o pese suficiente cantidad de muestra en un matraz de 100 mL y añada 60 mL de agua destilada. Añada con cuidado 5 mL de solución Carrez I, 5 mL de solución Carrez II y 10 mL de solución de NaOH (100 mM). Mezcle cada vez que añada un componente. Llene el matraz aforado hasta la marca, mezcle y filtre.

### 4. Consideraciones generales.

**(a) Muestras líquidas:** muestras claras, ligeramente coloreadas y aproximadamente neutras se pueden utilizar directamente en el ensayo.

**(b) Muestras ácidas:** Si se va a analizar más de 0,1 mL de muestra ácida sin diluir (como vino tinto o zumo de fruta con color), el pH de la solución se debe aumentar a 9,0 aproximadamente, utilizando 2 M NaOH, y la solución incubada a temperatura ambiente durante 30 min.

**(c) Dióxido de carbono:** las muestras que contengan dióxido de carbono se deben desgasificar aumentando el pH a 9,0 aproximadamente con 2 M NaOH y agitando suavemente o removiéndolo con una varilla de vidrio.

**(d) Muestras coloreadas:** es posible que haya que realizar una muestra adicional en vacío, es decir, una muestra sin Al-DH, en caso de muestras coloreadas.

**(e) Muestras muy coloreadas:** Si se utilizan sin diluir, las muestras muy coloreadas se deben tratar añadiendo 1 g/100 mL de carbón activado. Agite durante 2 minutos y a continuación filtre.

**(f) Muestras sólidas:** homogeneizar o triturar muestras sólidas en agua destilada y filtrar si fuera necesario.

**(g) Muestras que contengan grasas:** extraiga dichas muestras con agua caliente a una temperatura por encima del punto en que se derrite la grasa, por ejemplo, en un matraz de 100 mL. Ajuste a temperatura ambiente y llene el matraz hasta la marca con agua. Guárdelo en hielo o en un frigorífico durante 15-30 min y a continuación fíltrelo. Tire los primeros mL de lo que filtre, y utilice el sobrenadante claro (que puede estar ligeramente opalescente) para el ensayo. Otra alternativa es clarificar con reagentes Carrez.

**(h) Muestras que contengan proteína:** desproteíne las muestras con proteínas con reagentes Carrez.

### **EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:**

#### **(a) Determinación del acetaldehído en el vino blanco.**

Ajuste el pH del vino blanco a aproximadamente 9,0 con 2 M NaOH y utilícelo inmediatamente para el ensayo (0,10-0,50 mL). Si el vino blanco contiene sulfito, entonces se mide el “aldehído total”, es decir, la suma de los acetaldehídos libres y asociados al sulfito. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,2 mL es adecuado.*

#### **(b) Determinación del acetaldehído en el vino tinto.**

Si fuera necesario, decolore el vino tinto antes de utilizarlo en el ensayo. Esto se consigue de la siguiente forma: en una botella sellada de Duran<sup>®</sup> mezcle 25 mL de vino tinto con 0,5 g de PVPP, agítelo durante aproximadamente 5 minutos y filtre después una parte alícuota de la solución en papel Whatman No. 1. Échelo en una botella Duran<sup>®</sup> y tápelo de forma inmediata. Utilice la solución sin color que ha filtrado en el ensayo. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,2 mL es adecuado.*

#### **(c) Determinación del acetaldehído en la cerveza y el champán.**

Desgasifique las muestras que contienen dióxido de carbono aumentando el pH a 9,0 aproximadamente con 2 M NaOH y removiendo suavemente en una botella sellada Duran<sup>®</sup>. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,2 mL es adecuado.*

#### **(d) Determinación del acetaldehído en el zumo de fruta, concentrados y bebidas similares.**

La concentración de acetaldehído en soluciones claras y neutrales en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución y ajustando el pH a 9,0 aproximadamente). Los líquidos turbios en general solo hay que filtrarlos antes de la fase de dilución. Las soluciones coloreadas en general se pueden utilizar para el análisis después de diluirlas en una concentración adecuada de acetaldehído. Sin embargo, si las soluciones coloreadas requieren un análisis sin diluir, se pueden decolorar de la siguiente forma: en una botella sellada

de Duran® mezcle 25 mL de vino tinto con 0,5 g de PVPP, agítelo durante aproximadamente 5 minutos y filtre después una parte alícuota de la solución en papel Whatman No. 1. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,2 mL es adecuado.*

**(e) Determinación del acetaldehído en productos vegetales.**

Homogeeinice los productos vegetales con una batidora. Pese la muestra homogeneizada en un matraz y añada 60 mL de agua destilada y agite con fuerza el matraz cerrado para extraer el acetaldehído. Rellene el matraz hasta la marca y clarifique una parte alícuota filtrándola a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/A. Échelo en una botella Duran® y tápelo de forma inmediata. Clarifique con reagentes Carrez si fuera necesario. Diluya, si fuera necesario, y utilice un volumen de muestra de 0,10-0,50 mL. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,2 mL es adecuado.*

**(f) Determinación del acetaldehído en licores como el brandy.**

No es necesario tratar previamente el brandy. *Normalmente una disolución de 1:2 y un volumen de muestra de 0,2 mL es adecuado.*

**REFERENCIA:**

1. Beutler, O. H. (1988). Acetaldehyde In *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer, H. U. ed.) 3rd ed. **Vol VI** pp 601-613 VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

**NOTAS:**



**Megazyme International Ireland Ltd.,  
Bray Business Park, Bray,  
Co. Wicklow,  
IRLANDA**

**Teléfono: (353.1) 286 1220**

**Fax: (353.1) 286 1264**

**Página Web: [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)**

**Correo electrónico: [info@megazyme.com](mailto:info@megazyme.com)**

---

**SIN GARANTÍA**

La información contenida en este librete está, al mejor de nuestro conocimiento, verdad y exacto, pero puesto que las condiciones del uso están más allá de nuestro control, de ninguna garantía se da o se implica por lo que se refiere a cualquier recomendación o sugerencia que puedan ser hechas o que ningún uso no infringirá ninguna patentes.