

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

JULIANA PEREIRA ZANON REIS

***DOSAGEM DE ETANOL UTILIZANDO ÁLCOOL  
DESIDROGENASE DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO***

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO DA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”, COMO PARTE DAS EXIGÊNCIAS  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE **MESTRE EM  
CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edwil Ap. de Lucca Gattás  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maristela de Freitas Sanches Peres

ARARAQUARA - SP  
JULHO - 2006

À Aline e Otávio Augusto, meus afilhados.

Omairdes e José Antonio, meus pais.

Alcides, meu amor.

Meus sinceros agradecimentos:

À Deus, pelas oportunidades e desafios.

Aos meus familiares e amigos, tanto pelo incentivo e apoio em todos os momentos,  
quanto pela paciência e compreensão por minha ausência.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Edwil e a Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maristela pelo incentivo, apoio, paciência, conselhos e  
ensinamentos.

À amiga Luciana pela amizade conquistada, pelo companheirismo, prestatividade e  
agradáveis momentos compartilhados.

À Mara, Roseli, Lica e Adriana, técnicas em laboratório, pela ajuda na solução de  
problemas.

A todos que de diferentes maneiras contribuíram para a realização deste trabalho.

---

**SUMÁRIO**

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Etanol.....	03
2.2 Metodologias de dosagem de etanol.....	03
2.2.1 Físico-químicas.....	04
2.2.2 Cromatográficas.....	08
2.2.3 Enzimáticas.....	09
2.3 ADH.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIAL.....	17
4.1.1 Microrganismo.....	17
4.2 MÉTODOS.....	17
4.2.1 Obtenção do extrato celular bruto.....	17
4.2.1.1 Padronização das condições de obtenção do extrato celular bruto.....	19
4.2.2 Purificação parcial da ADH a partir de extrato celular bruto por fracionamento salino.....	20
4.2.3 Ensaio enzimático.....	21
4.2.3.1 Atividade da ADH pelo método ultravioleta (UV).....	21
4.2.3.2 Atividade da ADH pelo método colorimétrico.....	23
4.2.4 Ensaio do etanol.....	24
4.2.4.1 Ensaio do etanol utilizando método ultravioleta (UV).....	24
4.2.4.2 Ensaio do etanol utilizando método colorimétrico.....	26
4.2.5 Estabilidade da enzima álcool desidrogenase (ADH).....	27
4.2.5.1 Estabilidade térmica.....	27
4.2.5.2 Estabilidade a diferentes pHs.....	27

---

4.2.5.3 Estabilidade a diferentes temperaturas de estocagem.....	27
4.2.6 Determinação de proteína.....	28
4.2.7 Ensaio de recuperação.....	29
4.2.8 Desvios.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Rompimento da parede celular para obtenção de extrato rico em atividade de ADH.....	31
5.2 Tempo e velocidade de rompimento celular para obtenção de extrato bruto.....	32
5.3 Rompimento celular para obtenção de extrato bruto em diferentes tampões.....	32
5.4 Purificação parcial da ADH.....	33
5.5 Atividade da ADH pelo método ultravioleta (UV).....	36
5.6 Curva analítica de dosagem de etanol – método ultravioleta.....	36
5.7 Presença de aditivos durante estocagem sobre a estabilidade da álcool desidrogenase (ADH) em diferentes temperaturas.....	38
5.8 Efeito do tampão no preparo dos reagentes de cor.....	43
5.9 Concentração dos reagentes no ensaio.....	43
5.10 Adição de metais sobre a atividade da ADH.....	44
5.11 Adição de triton X-100 no ensaio.....	46
5.12 Efeito do pH e da temperatura no ensaio.....	47
5.13 Efeito da diluição do extrato enzimático sobre a atividade da ADH.....	49
5.14 Concentração do substrato (etanol) na atividade da ADH.....	49
5.15 Curva de tempo sobre a atividade da ADH.....	50
5.16 Estabilidade térmica a diferentes valores de pHs sobre a atividade da ADH.....	51
5.17 Curva analítica de dosagem de etanol – método colorimétrico.....	54
5.18 Determinação de etanol pelo método UV.....	56
5.19 Determinação de etanol pelo método colorimétrico.....	58
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

---

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Comparação dos processos de rompimento celular para obtenção do extrato bruto contendo ADH.....	31
Tabela 2 – Eficiência no rompimento celular utilizando o aparelho tipo “Bead Beater”.....	32
Tabela 3 – Efeito dos componentes, da concentração e do valor do pH da solução tampão no rompimento sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) utilizando aparelho tipo “Bead Beater”.....	33
Tabela 4 – Determinação da atividade enzimática da ADH nas diferentes etapas de fracionamento salino com sulfato de amônio.....	34
Tabela 5 – Etapas da purificação da ADH.....	35
Tabela 6 – Efeito da adição da azida de sódio 1 mM, PEG 5 e 15% e albumina de soro bovino 1%, sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) estocada em geladeira (4°C).....	39
Tabela 7 – Efeito da adição de aditivos de estabilização sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) durante estocagem em freezer (-18°C).....	40
Tabela 8 – Efeito da adição de aditivos sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) estocada a 30°C.....	41
Tabela 9 – Efeito da adição de aditivos sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) estocada em geladeira (4°C).....	42
Tabela 10 – Comparação da adição do MTT e PMS preparados em água e tampão salino (PBS).....	43
Tabela 11 – Efeito da concentração do MTT, NAD <sup>+</sup> e PMS na reação sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH).....	44
Tabela 12 – Efeito da adição de sais (2 mM) no ensaio enzimático da álcool desidrogenase (ADH) presente no extrato celular bruto.....	45
Tabela 13 – Efeito da adição de triton X-100 no ensaio da ADH presente no extrato celular bruto.....	46
Tabela 14 – Ensaio do etanol em diferentes amostras de bebidas alcoólicas utilizando a preparação enzimática rica em ADH do extrato parcialmente purificado.....	57

---

Tabela 15 – Ensaio de recuperação do etanol adicionado em amostra de vinho do Porto utilizando-se metodologia com determinação no UV (340 nm).....	57
Tabela 16 – Ensaio do etanol em diferentes amostras de bebidas alcoólicas utilizando a preparação enzimática com ADH do extrato celular bruto.....	58
Tabela 17 – Ensaio de recuperação do etanol adicionado em amostra de vinho do Porto utilizando-se metodologia com determinação no visível (570-655 nm)...	59

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Variação da velocidade de formação de NADH em função do tempo de reação.....	36
Figura 2 – Curva analítica do etanol obtida com a preparação enzimática parcialmente purificada da ADH (fração precipitada entre 35-60% de saturação salina). $R^2$ 0,98881.....	37
Figura 3 – Efeito de concentração de triton X-100 no ensaio de dosagem da ADH.....	47
Figura 4 – Determinação do pH ótimo no ensaio de dosagem da ADH.....	48
Figura 5 – Determinação da temperatura ótima no ensaio de dosagem da ADH..	48
Figura 6 – Efeito de diluição do extrato celular no ensaio de dosagem da ADH....	49
Figura 7 – Efeito de concentração de etanol no ensaio de dosagem da ADH.....	50
Figura 8 – Atividade da ADH em função do tempo de ensaio.....	51
Figura 9 – Estabilidade térmica da ADH.....	52
Figura 10 – Estabilidade da ADH presente no extrato celular bruto em diferentes pHs.....	52
Figura 11 – Estabilidade da ADH a temperatura ambiente por 80 horas.....	53
Figura 12 – Estabilidade da ADH a temperatura ambiente e a temperatura de geladeira.....	54
Figura 13 – Curva analítica do etanol obtida com o extrato celular bruto contendo ADH. $R^2$ 0,99093.....	55

**ABREVIATURAS**

A	Absorbância
ADH	Álcool desidrogenase
AIDH	Aldeído desidrogenase
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOD	Álcool oxidase
AOP	Álcool oxidase-peroxidase
BSA	Albumina de soro bovino
CG	Cromatografia gasosa
Cp	Conteúdo protéico
CPG	Vidro com porosidade controlada
DMF	Dimetilformamida
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
FI	Fluxo de injeção
FID	Detector de ionização de chama
GDH	Glicerol desidrogenase
GL	Gay-Lussac
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MTT	3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
PBS	Solução tampão fosfato salino
PEG	Polietileno glicol
PMS	Fenazina metosulfato
SDS	Dodecilsulfato de sódio
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultravioleta
$\lambda$	Comprimento de onda

## RESUMO

O presente trabalho descreve e compara duas metodologias enzimáticas de dosagem de etanol (métodos UV e colorimétrico), que utilizam desidrogenase alcoólica (álcool: NAD<sup>+</sup>: oxidoreductase EC 1.1.1.1) de fermento de panificação (Mauri Brasil Ind. Comp. e Imp. Ltda), adquirida no comércio na forma desidratada.

A atividade da álcool desidrogenase (ADH) presente no extrato bruto de levedura de panificação, da ordem de 5,66 U/mL, foi utilizada nos ensaios colorimétricos, enquanto que nos ensaios no ultravioleta (UV), atividades ao redor de 30 U/mL foram obtidas através da otimização das condições de extração e purificação parcial da ADH.

A estabilidade da ADH foi mantida durante 2 meses, na forma liofilizada a 4°C (retenção de 96,2% de sua atividade), na presença de 1 mM de azida de sódio. A mesma preparação enzimática, reconstituída em PEG 15% e armazenada durante 12 meses em freezer (-18°C), apresentou retenção de 50% de sua atividade até 2 meses.

O método ultravioleta de dosagem de etanol (detecção na faixa de  $2,3 \times 10^{-4}$  g/L a  $6,91 \times 10^{-3}$  g/L ou 5 µM a 150 µM) baseia-se na conversão enzimática do etanol a acetaldeído, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD<sup>+</sup> como aceptor de elétrons. O NADH formado pela reação é quantificado com leituras espectrofométricas a 340 nm, conforme descrito por Gattás (2002). Uma preparação enzimática parcialmente purificada e diluída foi utilizada na quantificação de etanol em diferentes bebidas, mostrando desvios dos teores alcoólicos de no máximo 2,1% quando comparados às especificações do produtor. O ensaio de etanol em vinho foi realizado com recuperação da ordem de 99,25% em amostra contendo, originalmente, 249,65 g/L de etanol.

O método colorimétrico de dosagem de etanol (detecção na faixa de  $4,6 \times 10^{-2}$  g/L a  $23,0 \times 10^{-2}$  g/L ou 1000 µM a 5000 µM) utiliza o sistema de reagentes de cor MTT/PMS, dissolvido em tampão fosfato salino (PBS), com leituras espectrofométricas a 570-655 nm. O ensaio de etanol em diferentes bebidas alcoólicas apresentou desvio máximo de 7,2% e recuperação da ordem de 99,91%, quando o etanol foi adicionado à amostra contendo, originalmente, 247,68 g/L de etanol originalmente. A enzima ADH apresentou pH ótimo de atividade em 8,5 e temperatura ótima aparente de atividade a 50°C; estabilidade térmica até 50°C durante 1 hora de estocagem e alta estabilidade a pH 6,0-7,0, após 80 horas de estocagem a temperatura ambiente.

Os resultados obtidos mostraram que as duas metodologias de dosagem de etanol utilizando preparações enzimáticas, obtidas de levedura seca de panificação, consistem em metodologias simples, com baixo custo efetivo, rápidas e precisas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Álcool desidrogenase, levedura de panificação, método de dosagem.

---

## ABSTRACT

The present work describes and compares two enzymatic methodology of ethanol dosage (UV and colorimetric methods), that use alcohol dehydrogenase (alcohol: NAD<sup>+</sup>: oxidoreductase EC 1.1.1.1) of baker's yeast (Mauri Brasil Ind. Comp. e Imp. Ltda) acquired in the commerce in the dry form.

The activity of the alcohol dehydrogenase (ADH) at around 5.66 U/mL present in the crude extract of baker's yeast was used in the colorimetric assay, whereas activities at around of 30 U/mL were obtained through the optimization of the extraction conditions and partial purification of ADH in the ultraviolet assay (UV).

The stability of liophilized ADH at 4°C was maintained for 2 months (retention of 96.2% of activity) in the presence of 1 mM sodium azide. The same enzymatic preparation reconstituted in PEG 15% and stored for 12 months in freezer (-18°C) presented retention of 50% of your activity up to 2 months.

The ultraviolet method of ethanol dosage (detection range of  $2.3 \times 10^{-4}$  g/L to  $6.91 \times 10^{-3}$  g/L or 5  $\mu$ M to 150  $\mu$ M) is based on the enzymatic conversion of ethanol into acetaldehyde, through oxido-reduction reaction with NAD<sup>+</sup> as the acceptor of electrons. The NADH formed by the reaction was quantified spectrophotometrically at 340 nm, as described by Gattás (2002). A partially purified and diluted enzymatic preparation was used for ethanol quantification in different beverages, showing alcoholic contents deviations up to 2.1% when compared to the specifications of the manufacturer. The ethanol assay in wine was accomplished with a recovery at around 99.25% in sample originally containing 249.65 g/L of ethanol.

The colorimetric method of ethanol dosage (detection range of  $4.6 \times 10^{-2}$  g/L to  $23.0 \times 10^{-2}$  g/L or 1000  $\mu$ M to 5000  $\mu$ M) uses the color reagents system MTT/PMS dissolved in saline phosphate buffer (PBS), determined spectrophotometrically at 570-655 nm. The assay of ethanol in different alcoholic beverages presented a maximum deviation of 7.2% and a recovery at around 99.91%, when the ethanol was added to the sample originally containing 247.68 g/L of ethanol. The enzyme ADH presented an optimum pH of activity of 8.5 and an optimum temperature at 50°C, the thermal stability up to 50°C during 1 hour of storage with highest stability on pH 6.0-7.0 after 80 hours of storage at room temperature.

The obtained results showed that both methodologies of ethanol dosage using enzymatic preparations, obtained from dry baker's yeast, turned into simple methodologies with low cost-effective, fast and accurate.

**KEYWORDS:** Alcohol dehydrogenase, baker's yeast, methods of dosage.

## 1. INTRODUÇÃO

O mais direto produto da Biotecnologia é o próprio microrganismo, obtido por meio da multiplicação em massa. A produção de biomassa de microrganismos unicelulares tem na levedura de panificação uma antiga e rica fonte de proteínas. Acredita-se que o aproveitamento industrial do levedo pelos fabricantes de bebidas começou em 1781, pelos holandeses, nas destilarias de Gim. Em 1792, os ingleses já produziam fermento de panificação, usando o mosto da indústria cervejeira, sem o lúpulo. Em 1846, desenvolveu-se o processo vienense, obtendo-se dez a doze quilos de biomassa e 28 litros de álcool, a partir de cem quilos de grãos de cevada. Hoje, com a evolução do conhecimento e com diversas melhorias no processo, é possível obter maiores rendimentos de biomassa, sem a produção de álcool.

As leveduras são usadas na indústria de alimentos como agentes de fermentação, na fabricação de pães, cervejas e vinhos há milhares de anos (ROSEN, 1987).

No Brasil, atualmente se produz uma grande quantidade de biomassas de levedura como subproduto das indústrias de cerveja e das destilarias produtoras de etanol. O setor de álcool combustível tem uma produção anual de aproximadamente 240 mil toneladas (FURCO, 1996).

Na maior parte dos países, a levedura de panificação é o *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, a espécie *Saccharomyces rosei* e outras leveduras pertencentes ao gênero *Zygosaccharomyces* e *Torulaspota* são bastante utilizadas em panificação para atuarem como fermento em massas doces.

A levedura vem sendo empregada como fonte de enzima durante décadas. A aplicação destes biocatalizadores tem-se estendido à vários setores produtivos, dentre os que destacam a produção de cerveja, produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos, de limpeza e química fina em geral (SOMERS et al., 1997; DEVAUX-BASSÉGUY, et al., 1997).

As enzimas que estão presentes no meio celular da levedura são principalmente as oxidorreduções, que podem ser subdivididas em oxidases, oxigenases e desidrogenases. As enzimas do fermento de pão podem ser empregadas na redução de carbonilas de cetonas e aldeídos, nitrilas,  $\alpha$ - e  $\beta$ -cetoésteres e análogos, e duplas ligações C=C. Alguns trabalhos têm sido

realizados com o intuito de verificar o mecanismo e a estereosseletividade destas reações. Dentre essas, as álcool desidrogenases (ADHs) e as lactato desidrogenases são as enzimas responsáveis pela catálise na redução estereosseletiva de compostos carbonílicos e derivados (WONG e WHITESIDES, 1995).

O uso das enzimas possui várias vantagens destacando-se principalmente: alta especificidade, obtenção de produtos puros e alta capacidade de regeneração, sem sofrer degradação. Devido a estas propriedades, as enzimas servem como catalisadores de reações para quantificação de substâncias químicas.

A dosagem do etanol é descrita na literatura como sendo de grande importância em diversas áreas tais como a saúde, alimentos e bebidas, e na produção de bioetanol (BEUTLER, 1977).

O interesse na determinação do etanol surgiu do monitoramento de sua formação para controlar a fermentação (NICULESCU et al., 2003), da necessidade de verificação do limite legal de aceitação, da influência nas características sensoriais (MATAIX e LUQUE DE CASTRO, 2000), do importante efeito no crescimento das leveduras (KITAGAWA et al., 1991) e, por razões econômicas, particularmente na relação entre as taxas impostas para álcool em diferentes países (YARITA et al., 2002).

Portanto, a determinação de etanol é crítica para o controle de qualidade na indústria de bebidas (FLETCHER e STADEN, 2003), além de servir de dosagem de apoio na fabricação de combustíveis (álcool etílico e biodiesel). Uma metodologia de quantificação do etanol, rápida, econômica e que produza resultados de fácil interpretação facilitará os cálculos dos rendimentos dos processos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ETANOL

O etanol (álcool etílico),  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , é um dos principais álcoois que existe. Trata-se de um líquido incolor, inflamável e de odor característico, miscível em água e em outros compostos orgânicos. Apresenta seu ponto de fusão de  $-114,1^\circ\text{C}$  e de ebulição de  $78,5^\circ\text{C}$ , sendo também menos denso que a água:  $0,789\text{ g/mL}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

Obtém-se o etanol por três maneiras gerais: por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa, que é a mais importante no Brasil (LIMA et al., 2001).

As leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*, são os microrganismos principais na obtenção do etanol por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, também são capazes de produzir etanol, porém, economicamente inviáveis (LIMA et al., 2001).

A fermentação para produção de etanol envolve 12 reações em seqüência ordenada (LIMA et al., 2001) e consiste, em síntese, na transformação do açúcar (ou cereais, como a cevada e o malte) em álcool e gás carbônico, sob a ação das leveduras (RASOVSKY, 1973).

A determinação de etanol é crítica para o controle de qualidade de bebidas (FLETCHER e STADEN, 2003).

Em vinhos, a quantidade de etanol está na faixa entre  $09$  e  $15^\circ\text{GL}$  (MATAIX e LUQUE DE CASTRO, 2000). Acima desta concentração o etanol produzido torna-se tóxico às enzimas envolvidas na fermentação (NICULESCU et al., 2003). O etanol e o  $\text{CO}_2$  são produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a levedura, em anaerobiose (LIMA et al., 2001).

### 2.2 METODOLOGIAS DE DOSAGEM DE ETANOL

Existem vários métodos para determinar a concentração de etanol em bebidas alcoólicas, que se subdividem em físicos, químicos e enzimáticos.

O principal objetivo é encontrar um método capaz de analisar um grande número de amostras em termos de rapidez, simplicidade, sensibilidade e custo

(SREEKUMAR e BASAPPA, 1990). Ensaios de rotina, numa indústria de alimentos ou mesmo em laboratórios de controle, exigem metodologias simplificadas, de baixo custo e de boa resolução na análise.

Os principais métodos realizados na análise enzimática de alimentos são: o método UV (baseado na medida do aumento ou diminuição da absorbância da coenzima NADH) e o método colorimétrico.

### 2.2.1 FÍSICO-QUÍMICAS

A determinação da densidade (método físico) é uma das medidas mais simples e comum na análise de alimentos, utilizada principalmente em amostras no estado líquido inclusive pelo Instituto Adolfo Lutz (LARA et al., 1976). A metodologia de análise pode ser por picnometria (através de um picnômetro), ou por flutuação, aplicada de duas maneiras gerais na obtenção da gravidade específica: por flutuação de um corpo mergulhador (através da balança de Westphal), ou por hidrometria (através de um densímetro) (CECCHI, 1999).

As diferentes escalas usadas pelos densímetros podem dar a leitura direta da densidade ou em graus de uma escala arbitrária como Gay-Lussac (alcoômetro), na qual os graus referem-se à percentagem em volume de álcool em água (LARA et al., 1976).

Em bebidas alcoólicas, seja as fermentadas, as fermento-destiladas e também as compostas (como os licores), determina-se o álcool em volume através de um alcoômetro de Gay-Lussac, que consiste em medir 250 mL de uma amostra a 15°C e transferir para um balão de destilação de 500 mL. Coletar 180 mL do destilado em balão volumétrico de 250 mL, acertar o volume com água e transferir a solução para um cilindro de vidro de 250 mL; todo o procedimento deve ser feito a 15°C. Por fim, mergulhar nessa solução, o alcoômetro de Gay-Lussac (GL). Com divisões de décimos de grau, a leitura no alcoômetro dará diretamente a percentagem de álcool em volume. Para as bebidas alcoólicas fermentadas, vinho e cerveja, a quantidade de amostra a ser analisada é de 200 mL (LARA et al., 1976).

Para saber o álcool em peso, multiplicar por 0,8 o número de mL de álcool (percentagem de álcool em volume) obtido anteriormente (LARA et al., 1976).

Este método da picnometria é bastante utilizado quando o mais importante é a rapidez, mas sempre se deve estar atento a temperatura, pois qualquer variação

desta pode-se afetar a medida de densidade, que decresce cerca de 0,03% por °C de aumento de temperatura (CECCHI, 1999). A hidrometria apresenta como vantagens o baixo custo, exatidão e não requer padrão. As desvantagens são longo período de destilação e a delicadeza do aparelho (hidrômetro) (VALLESI e HOWELL, 2002).

O método oficial designado pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997) para a determinação de álcool por volume em cerveja, vinho e bebidas destiladas é a picnometria, com o uso do picnômetro, método mais comum de determinação de densidade.

Esse método consiste na determinação do peso de um volume conhecido do líquido em um picnômetro, cujo volume seja calibrado em termos de peso da água pura no mesmo picnômetro. A partir deste valor obtêm-se a % de álcool por volume.

O picnômetro de 100 mL é pesado vazio, após ser lavado e secado completamente. Depois deve ser calibrado com água recentemente destilada, isto é, encher o picnômetro com água destilada, tampá-lo e colocá-lo em uma porção de água a temperatura constante por um determinado tempo. Em seguida, retira-se o picnômetro, o qual é seco e pesado em balança analítica após 15 minutos.

Para a medida da solução a ser analisada, previamente destilada, tira-se à água do picnômetro e lava-se com um pouco desta solução. Em seguida, enche-se o mesmo com a solução e toma-se o peso, com o cuidado para não haver a formação de bolhas, pois acarretaria em erros. A operação é sempre realizada a temperatura de 15,56°C (60°F) e a partir desses valores, obtêm-se a % de álcool por volume.

Para a realização deste ensaio, requer-se uma balança analítica de boa qualidade, colocada em um lugar sem vibrações e sem correntes de ar, e um picnômetro, provido de um termômetro (AMERINE e OUGH, 1976). Os picnômetros são feitos de vidro resistente e com baixo coeficiente de expansão térmica (CECCHI, 1999).

A picnometria é considerada como método de referência e tem como vantagens a exatidão e a não requisição de padrão. A desvantagem seria a metodologia trabalhosa, que requer muito tempo na sua realização e uma balança de precisão (VALLESI e HOWELL, 2002).

Além da picnometria, a AOAC sugere ainda a refratometria para a determinação de álcool por volume em cerveja, vinho e bebidas destiladas. Além disso, apresenta outros métodos para a determinação em vinhos, como a oxidação por dicromato e a cromatografia gasosa.

Todos os métodos da AOAC para determinação de álcool requerem pré-destilação, geralmente considerada como o primeiro passo para evitar erros ao longo de todo o processo de determinação (WANG et al., 2004).

O método mais antigo para a determinação de etanol é a quantificação da gravidade específica, feita depois da destilação do etanol (BEUTLER, 1977). Este método é demorado, pouco sensível e requer uma grande quantidade de amostra (cerca de 100 mL) por análise (SREEKUMAR e BASAPPA, 1990).

Para o etanol ser determinado a 20°C por este método, 100 mL de amostra com mais 40 mL de água são destiladas para coletar 100 mL do destilado (SREEKUMAR e BASAPPA, 1990).

A amostra do material é destilada em um sistema fechado e os compostos voláteis são coletados em um recipiente, também fechado. A densidade do destilado é determinada aerometricamente ou picnometricamente. Tais medidas são seguras somente para a exata determinação de altas concentrações de etanol (>10% p/v). Além disso, freqüentemente, são obtidos resultados incorretos em determinações de etanol em vinho devido à concentração de outros compostos voláteis (aldeídos e substâncias aromáticas) em alta quantidade (cerca de 1% p/v) (BEUTLER, 1977).

Um método físico é o da refratometria, onde o índice de refração de uma solução varia regularmente com a concentração do soluto. Sendo assim, a composição da solução pode ser estimada através de seu índice de refração por comparação com tabelas de referência, sendo o refratômetro Abbe o mais comum e mais usado (CECCHI, 1999).

Os álcoois secundários são, entre os compostos dos destilados, os que principalmente interferem na determinação (AMERINE e OUGH, 1976).

Um novo método do índice de refração foi desenvolvido com grande exatidão para medir a intensidade alcoólica em amostras de bebidas alcoólicas de pequeno volume e confrontado, tanto com o método de índice refrativo, utilizado pela comunidade européia, quanto com o método de referência do picnômetro utilizado pela AOAC (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU et al., 2003).

A análise por fluxo de injeção é um processo analítico automático ou semi-automático, tendo como fundamento a inserção seqüencial de volumes de soluções de amostras em um fluido não segmentado, dirigido continuamente para um sensor, onde o analito é detectado (CIENFUEGOS e VAITSAMAN, 2000). Baseado neste

método, González-Rodríguez et al. (2003) fizeram determinações do conteúdo alcoólico em bebidas.

Um método de análise de injeção seqüencial usando detecção espectrofotométrica tem sido desenvolvido para determinar etanol em amostras com um limite de detecção de 0,09% (v/v) e linearidade até 6% (FLETCHER e STADEN, 2003).

Um método de análise foi desenvolvido para a determinação indireta da concentração de etanol em bebidas alcoólicas, em função da concentração do vapor de água, baseado num sensor capacitimétrico (LIU e TUBINO, 1998).

A oscilação acústica também vem sendo utilizada nas determinações de etanol e apresentado em literaturas mais recentes. Baseado neste método, Gomes et al., (2001) quantificaram álcool em soluções aquosas. A freqüência mínima de impedância de um simples cristal de quartzo em contato com solução de etanol mostrou-se um parâmetro adequado para quantificar etanol. O etanol foi analisado em alguns vinhos portugueses pela metodologia proposta e pelo método aerométrico, usando um alcoômetro, com diferenças estatísticas não significativas na precisão ou exatidão dos resultados.

Lau e Luk (1994) desenvolveram um método espectrofotométrico simples e rápido (15 minutos) para determinação de sub percentagens de etanol em bebidas baseia-se na reação colorimétrica entre etanol e Ce (IV). Calibração linear até 0,78% v/v e nível de etanol de 0,34% v/v. A quantidade de etanol em um número de bebidas e amostras de cerveja foi determinada e comparada com os resultados dos métodos da AOAC e da cromatografia gasosa.

Dentre os métodos químicos, através de reações de oxidação, obtêm-se bons resultados com o uso do dicromato de potássio para oxidar etanol a ácido acético na presença de ácido sulfúrico. O dicromato de potássio é um agente oxidante poderoso, usado em solução ácida e que se reduz rapidamente, na temperatura ambiente, ao sal de cromo (III) verde (VOGEL, 1992). Para oxidar completamente etanol a ácido acético requer-se uma concentração adequada de íons hidrogênio, evitando que o álcool se oxide a uma mistura de acetaldeído e ácido acético (AMERINE e OUGH, 1976).

## 2.2.2 CROMATOGRÁFICAS

Cromatografia é uma técnica muito usada de separação dos componentes de uma amostra, entre duas fases: estacionária e móvel; sendo que esta última elui entre os interstícios ou sobre a superfície da fase estacionária (CECCHI, 1999).

A determinação do etanol em grandes destilarias é realizada através de metodologias que englobam técnicas cromatográficas: CG ou HPLC. Estas metodologias são muitas vezes inacessíveis para pequenas indústrias, devido ao alto preço dos equipamentos e a exigência de operadores altamente treinados.

Apresenta como vantagens a exatidão, a automação e a possibilidade de ser usado para outras análises. Como desvantagens apresenta o alto custo da operação (VALLESI e HOWELL, 2002), equipamentos caros e operadores treinados (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU et al., 2003), e o fato das medições serem relativas a um etanol padrão, cuja qualidade dependerá a exatidão do método (BEUTLER, 1977).

Sreekumar e Basappa, (1990) usaram como padrão interno o n-propanol para análise de uma amostra de etanol determinado por cromatografia gasosa usando um detector de ionização de chama. A seguinte fórmula (altura do pico de etanol ÷ altura do pico de propanol) ÷ F, sendo F a inclinação da curva padrão, foi usada para a determinação da concentração do etanol em % v/v.

Uma variação dessa metodologia foi desenvolvida para determinar simultaneamente etanol e metanol em bebidas alcoólicas, utilizando dois padrões internos (acetonitrila e 2-pentanol) e injeção direta na coluna capilar de mega-poro, com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm, com detector de ionização de chama (FID). A taxa de fluxo do gás de arraste (nitrogênio) foi de 3 mL/min e a temperatura de injeção e detecção foi de 210 e 280°C, respectivamente. A quantia de etanol e metanol nas bebidas alcoólicas pode ser obtida em menos de 12 minutos, sendo que o tempo de retenção do metanol e etanol do método foi de 2,87 e 3,41 minutos, respectivamente. Os resultados mostraram que esse método é tão seguro quanto o proposto pela AOAC, mais rápido e não requer pré-tratamento da amostra (WANG et al., 2004).

Kitagawa et al., (1991) também usaram um cromatógrafo gasoso e um detector de ionização de chama na determinação do etanol. Coluna capilar (0,31 mm diâmetro

interno e 50 m de comprimento) e com temperatura de injeção de 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio.

O comitê de análise do Instituto de Brewing testou um método para determinação de etanol em cerveja por cromatografia gasosa usando injeção direta. Os valores da repetibilidade e da reprodutibilidade são 0,061 e 0,136 respectivamente, em uma faixa de extensão de etanol de 0,93 a 6,05%, sendo que até 9% de etanol os valores de repetibilidade e reprodutibilidade aumentam para 0,154 e 0,284 (BUCKEE e MUNDY, 1993).

Yarita et al. (2002) propõem a adoção de um método para determinação de etanol em bebidas alcoólicas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de ionização de chama (HPLC-FID) usando água pura na fase móvel e sílica gel na fase estacionária. Os resultados obtidos indicaram que o método proposto é seguro para a determinação de etanol.

Um procedimento utilizando HPLC para analisar eficientemente ácidos orgânicos, açúcares, glicerol e etanol em vinhos Cynthiana (*Vitis aestivalis*) e Syrah (*Vitis vinifera*) foi desenvolvido por Walker et al., (2003). Fez-se uma comparação do desvio padrão e do coeficiente de variação dos componentes dos vinhos em questão com um rápido teste enzimático comercial, indicando que os valores obtidos por HPLC são mais exatos.

### 2.2.3 ENZIMÁTICAS

Muitos métodos enzimáticos para a determinação de etanol têm sido desenvolvidos por resultarem em determinações mais baratas, precisas e de fácil manuseio.

A maioria deles tem sua origem no procedimento de Bonnichsen (1965), em que, o etanol é oxidado para acetaldeído pelo dinucleotídeo nicotinamida adenina (NAD<sup>+</sup>) na presença da enzima álcool desidrogenase (ADH) (BEUTLER, 1977). A formação da forma reduzida do dinucleotídeo (NADH) medida na extensão de 334, 340 e 365 nm é proporcional a quantidade de etanol (SREEKUMAR e BASAPPA, 1990). Trata-se de um ensaio de grande sensibilidade e é empregado com soluções contendo menos do que 1% em volume de etanol (AMERINE e OUGH, 1976). Este método foi empregado no presente projeto utilizado uma preparação enzimática parcialmente purificada de levedura de panificação rica em desidrogenase alcoólica.

O equilíbrio da reação está voltado no sentido da formação do etanol e o deslocamento da reação no sentido contrário, o que só acontece em condições alcalinas, sendo o NADH gerado nesta reação quantificado a um comprimento de onda de 340 nm. A quantidade de NADH gerado é proporcional a quantidade de etanol consumido (BERNT e GUTMANN, 1974). A utilização deste método de dosagem requer uma enzima altamente purificada.

Um outro meio de deslocar o equilíbrio desfavorável da reação de ADH para a determinação de etanol é remover o acetaldeído formado. Ele pode ser oxidado quantitativamente para acetato usando a enzima aldeído desidrogenase (AIDH, EC 1.2.1.5) na presença de  $\text{NAD}^+$ . As vantagens deste processo são alta velocidade de reação na conversão do etanol, alta especificidade e aumento na sensibilidade. O método descrito é baseado no método de Beutler (1977).

O ensaio enzimático do etanol a pH 8,5, utilizando-se a álcool desidrogenase obtida de uma preparação enzimática parcialmente purificada de levedura de panificação, está sendo utilizado no nosso laboratório. A faixa de detecção do etanol é de 162 à 648  $\mu\text{M}$  ou  $74,52 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$  à  $298,08 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$  (GATTÁS et al., 2002).

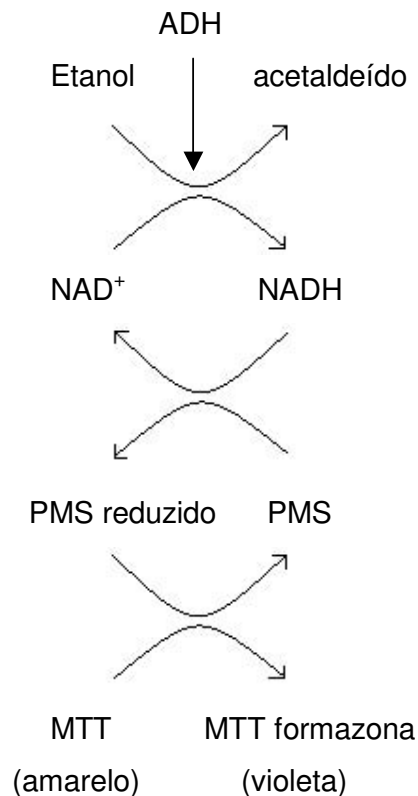
Nosso trabalho de pesquisa propõe uma metodologia com algumas modificações do ensaio descrito por Racker (1955) baseada na conversão enzimática do etanol a acetaldeído, através de reação de óxido-redução, tendo o  $\text{NAD}^+$  como acceptor de elétrons.



A atividade do extrato enzimático frente ao etanol será feita pela diferença de absorbância a 340 nm por minuto entre o ensaio e o branco correspondente. A reação enzimática deve conter:  $\text{NAD}^+$  0,015 M; etanol (faixa de 0,8-1,9 mg/mL) ou amostras; tampão pirofosfato de sódio/semicarbazida/glicina 0,01 M, água destilada e extrato enzimático para um volume final de 3,24 mL. A reação é iniciada pela adição do extrato enzimático.

Ensaio enzimáticos colorimétricos para dosagem de etanol, utilizando sal de tetrazólio tem aplicabilidade em ensaios de rotina. Os sais de tetrazólio também são largamente usados como indicadores de sistemas redutores. Quando os sais de tetrazólio são reduzidos, eles dão início a coloração do cristal de formazana (TELLEIR et al., 1992). Um ensaio usando um composto de tetrazólio

{5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-3-(4-sulfofenil)} indica a presença de desidrogenase nas células (LEVERONE, et al., 1996). Quando o MTT é usado com o reagente fenazina metassulfato (PMS), ele pode ser reduzido para formação da formazona (BUTTKE et al., 1993 e CORY et al., 1991). Esta metodologia utilizando sal de tetrazólio foi utilizada no presente projeto para determinar as concentrações de etanol em bebidas.



Os sais de tetrazólio são largamente usados como indicadores de sistemas redutores. Quando os sais de tetrazólio são reduzidos, eles dão início a coloração do cristal de formazona, (TELLIER et al., 1992) que absorvem em comprimento de onda igual a 570 nm (ABE e MATSUKI, 2000).

A utilização de reações coloridas, que envolvam álcoois desidrogenases, é bastante explorada na literatura: Cheliak e Pitel, 1984; Micales et al., 1986; Shaw, 1965, com possibilidade de revelação da atividade enzimática em gel de poliacrilamida.

Mattos et al. (1995) usaram um sistema de injeção de fluxo (FI) para determinação simultânea de glicerol e etanol usando enzimas imobilizadas em vidro

com porosidade controlada (CPG) e detecção espectrofluorimétrica. O método é baseado na oxidação do glicerol e etanol pela nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) catalisada pela glicerol desidrogenase (GDH) e pela álcool desidrogenase (ADH), respectivamente. A coenzima reduzida, nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NADH}$ ) formada foi monitorada espectrofluorimetricamente ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ).

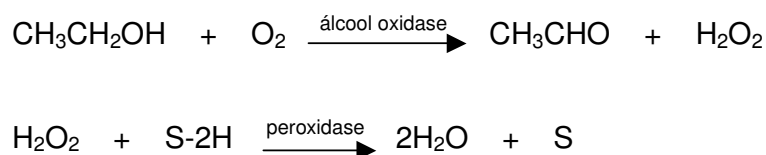
Rangel e Tóth (2000) usaram uma metodologia semelhante à de Mattos et al. (1995) para determinação seqüencial de glicerol e etanol com detecção espectrofotométrica, fazendo um pré-tratamento mínimo da amostra e diluição de 50 vezes. As reações enzimáticas envolvidas são as mesmas do método já citado anteriormente. A mudança de absorbância causada pela produção do  $\text{NADH}$  permite a quantificação espectrofotométrica dos analitos a 340 nm. A detecção "multi site" permite monitorar o sinal de absorbância em dois canais de analitos independentes, usando um detector simples. A extensão da determinação de etanol está entre 0,05 a 0,5% (v/v).

Mataix e Luque de Castro (2000) projetaram um método que integra um módulo de evaporação para determinações simultâneas de etanol e glicerol. A evaporação analítica possibilita a remoção do etanol do vinho para a determinação do glicerol. O etanol evaporado é coletado em uma solução contendo dicromato de potássio e ácido sulfúrico. Nesta reação, o etanol é oxidado e o  $\text{Cr}_3^+$  formado é monitorado no espectrofotômetro a 600 nm. O restante da amostra juntamente a soluções tampão e o  $\text{NAD}^+$  passam através do reator de glicerol desidrogenase imobilizada (GDR) onde acontece à oxidação do glicerol. O  $\text{NADH}$  formado é monitorado espectrofluorimetricamente a  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ .

A técnica fluorimétrica, também é utilizada para determinação do etanol. Um método enzimático fluorimétrico para determinação do etanol é baseado nas mudanças fluorescente intrínseca, causada na álcool desidrogenase (ADH) durante a reação enzimática, onde a coenzima  $\text{NAD}^+$  é reduzida para a forma  $\text{NADH}$ . O estudo é feito na origem do sinal fluorescente da ADH usando um modelo matemático, sendo a extensão da concentração do etanol de  $5,5 \times 10^{-5}$  a  $3,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ . O método é aplicado para baixas concentrações de etanol em amostras de drinque e vinagre (MARCOS et al., 1997).

Outras enzimas podem ser utilizadas nas reações de quantificação de etanol, ou seja, o etanol além de ser determinado bioquimicamente pela oxidação com  $\text{NAD}^+$  na presença da enzima álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1), também pode ser convertido pela álcool oxidase (EC 1.1.3.13) (BEUTLER, 1977).

Gonchar et al. (2001) desenvolveram um Kit para ensaios de etanol em bebidas alcoólicas. As análises feitas em vinhos, cervejas e drinques fortes tiveram uma boa correlação com o método que utiliza álcool desidrogenase. O princípio do método para determinação de etanol por álcool oxidase-peroxidase (AOP) é baseado na medida da acumulação do pigmento produzido na oxidação peroxidativa do cromogene com  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado na reação do etanol com álcool oxidase:



As enzimas podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizadas constituindo os eletrodos enzimáticos.

O eletrodo enzimático tem muitas vantagens sobre os métodos que utilizam enzimas livres devido a sua alta seletividade, simplicidade e por poder detectar diretamente etanol em amostras líquidas. O eletrodo enzimático que usa álcool oxidase (AOD) é de fácil construção e tem sido muito utilizado para medir etanol. Este eletrodo não responde somente para etanol, mas também para outros alcóois e diversos ácidos orgânicos. Infelizmente, muitos desses eletrodos são estáveis somente por 1 a 2 semanas (KITAGAWA et al., 1991).

Kitagawa et al. (1991) desenvolveram um novo sensor de álcool que usa álcool desidrogenase imobilizado (ADH) de *Gluconobacter suboxydans*. Neste o etanol é oxidado a acetaldeído na presença da enzima, e simultaneamente, o aceptor de elétron oxidado hexaciano-ferrato III é reduzido. Quando o eletrodo tem potencial adequado, o aceptor de elétron reduzido é oxidado e os elétrons são transportados para o eletrodo. A corrente é proporcional a concentração de etanol e a extensão pode variar de 0,5 a 200  $\mu\text{A}$ . A resposta do sensor decresce linearmente cerca de 90% do valor inicial depois de 9 dias. A concentração de etanol pode ser determinada por um longo período (1 mês ou mais) se for usado o método da calibração automática. O período de medição de uma amostra varia de 60 segundos

(baixa concentração) até 180 segundos (alta concentração), sendo que o período total de medição de uma simples amostra varia de 2,5 a 5,5 minutos. A concentração de etanol determinada foi na faixa de 0 a 200 mM.

Uma outra variação da metodologia, que utiliza enzima imobilizada é descrita a seguir: a álcool oxidase é imobilizada em membrana de difusão gasosa permitindo uma alta especificidade na determinação de etanol com detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio formado. Este sistema de fluxo de análise tem um limite de detecção de 0,0001% (v/v) de etanol. O etanol de amostras de cerveja e vinho foi analisado por Mohns e Künnecke (1995), sem nenhum pré-tratamento ou diluição, através do sistema de análise de fluxo com membrana de separação e "time based sampling". O princípio do método seria que o etanol permeável pela membrana será acumulado na unidade de difusão, e, depois de 30 segundos, será arrastado para o reator enzimático, onde será convertido para acetaldeído e peróxido de hidrogênio e a oxidação detectada pelo eletrodo. Uma membrana com 500  $\mu\text{m}$  de espessura foi usada para determinar etanol em cerveja e uma com 400  $\mu\text{m}$  para vinho. A especificidade de detecção do sistema aumenta significativamente com o uso de separação por difusão gasosa.

Biosensores amperométricos baseados em desidrogenases tem sido desenvolvido para determinar etanol, glicose e glicerol. A enzima é integrada em um hidrogel redox usando um polímero não condutor. Niculescu et al. (2003) determinaram etanol, glicose e glicerol através do biosensor em vários tipos de vinho e os dados obtidos foram comparados com métodos espectrofotométricos. O biosensor mostrou resposta sensível de etanol na extensão de concentração de 2,5 a 250  $\mu\text{M}$ , limite de detecção de 1,2  $\mu\text{M}$  e sensibilidade de 200  $\text{mA M}^{-1}$ .

### 2.3 ADH

As enzimas são catalisadores biológicos de reações, altamente específicos, que podem oferecer resultados de análises em apenas alguns segundos, sendo que, a formação de produtos ou o consumo de substrato podem ser monitorados em diversos tipos de aparelhos.

O processo de atuação das desidrogenases requer a presença de cofatores (coenzimas) que são os responsáveis pela transferência de hidrogênio, no caso das biorreduções. A maioria das desidrogenases utiliza cofatores do tipo nicotinamidas, que podem ser reciclados através de métodos químicos ou enzimáticos. A relação enzima-coenzima pode ser classificada de diferentes maneiras. Além da necessidade de cofatores, outro aspecto mecanístico nas biotransformações é a relação do substrato com o sítio ativo da enzima, para a qual várias teorias têm sido desenvolvidas com o objetivo de entender o processo da catálise enzimática. Entre estas se pode citar o mecanismo chave e fechadura, do estado induzido, teoria da dessolvatação e dos três pontos (FABER, 1995).

A teoria dos três pontos é amplamente usada para explicar a enantiosseletividade das enzimas. Para obter um alto grau de enantiosseletividade, um substrato deveria ser firmemente preso no espaço em 3 dimensões. Entretanto, eles deveriam ter pelo menos 3 pontos diferentes de ataque do substrato no sítio ativo (BARALDI e CORRÊA, 2004).

As desidrogenases são amplamente utilizadas nos ensaios enzimáticos de diversos compostos de interesse industrial, incluindo o etanol. A forma mais simples de acompanhar as reações que envolvem estas enzimas consiste em realizar medidas baseadas na formação ou consumo da forma reduzida do nucleotídeo (NADH).

A desidrogenase alcoólica (álcool: NAD<sup>+</sup>: oxidoreductase EC. 1.1.1.1) está presente em tecido animal, plantas e microrganismos (BRÄNDÉN et al., 1975). É uma enzima de peso molecular alto (ao redor de 150 Kda) e que atua em outros álcoois alifáticos com menos afinidade (proporcional ao número de carbonos). Racker (1955) determinou as propriedades e a purificação da ADH que utilizamos no ensaio do etanol.

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como meta os seguintes objetivos:

1. Melhorar o processo de obtenção e de purificação parcial de extratos celulares brutos de leveduras de panificação ricos em atividade de álcool desidrogenase.
2. Padronizar o ensaio enzimático para leituras na região do visível (570-655 nm) a fim de determinar etanol, utilizando extratos celulares de leveduras de panificação contendo álcool desidrogenase.
3. Estudar a estabilidade da atividade da ADH durante o armazenamento em diversas temperaturas.
4. Determinar a concentração de etanol em diferentes amostras de bebidas alcoólicas utilizando os ensaios enzimáticos padronizados no presente trabalho (UV e colorimétrico).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 MICRORGANISMO

Leveduras secas de fermento de panificação adquirido no comércio, de procedência Mauri Brasil Ind. Com. e Imp. Ltda, Pederneiras, São Paulo, foram utilizadas.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR BRUTO

O extrato celular bruto foi obtido de três maneiras:

A – Rompimento celular em homogeneizador tipo “Bead Beater”, como descrito por Tininis (2001), com modificações:

Uma quantidade de 10 g de leveduras secas de fermento de panificação (massa salgada) foi suspensa em 100 mL de solução tampão citrato de sódio 2 mM, pH 6,2, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM. O rompimento celular foi realizado por trituração com pérolas de vidro de 425–600 micras (Sigma nºG-8772) em homogeneizador tipo “Bead Beater”. O tempo total de rompimento foi de 45 minutos, velocidade 13500 rpm, em banho de gelo. O material homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, em centrifuga refrigerada (Incibrás Spin VI) e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima.

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução tampão citrato 2 mM, pH 6,2, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM: pipetou-se 2 mL da solução estoque de ácido cítrico 100 mM em 80 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 6,2 com hidróxido de sódio (Synth), (em pHmetro Marconi MA

200), adicionou-se 14  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (Riedel-de Haën) e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

- Solução estoque de ácido cítrico 100 mM: pesou-se 2,1014 g de ácido cítrico (Synth), dissolveu-se em 80 mL de água destilada e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

B – Rompimento celular em agitador de tubos, como descrito por Gattás e Peres (2003), com modificações:

Uma quantidade de 1,5g de pérolas de vidro de diâmetro 425–600 micra foi colocada em um frasco de fundo chato juntamente com 100 mg de leveduras secas de fermento de panificação (massa salgada) suspensa em 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio 2 mM, pH 6,2, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM. O material congelado por 12 horas foi submetido à agitação durante seis ciclos de 30 segundos em um agitador (Phoenix AP 56) ficando em intervalos de mesmo período em banho de gelo. O sobrenadante foi separado por centrifugação, 12000 rpm por 10 minutos, em centrífuga Eppendorf AG Mod 5415 R e utilizado como fonte de ADH.

C – Rompimento celular como descrito por Guagliardi et al. (1996), com modificações:

Uma outra forma de rompimento foi testada como segue: 10 g de levedura seca de fermento de panificação (massa salgada) foi suspensa em 50 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo 10% (v/v) de glicerina, 0,8 M de cloreto de sódio e 0,7 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. As células de levedura foram rompidas por trituração utilizando-se 5 g de areia tratada durante 30 minutos em almofariz. O sobrenadante foi coletado por centrifugação durante 40 minutos a 7000 rpm.

#### PREPARO DA SOLUÇÃO:

- Solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo 10% (v/v) de glicerina, 0,8 M de cloreto de sódio e 0,7 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol: pesou-se 0,0062 g de fosfato de sódio monobásico (Reagen) e 0,0438 g de fosfato de sódio dibásico (Synth), dissolveu-se em 50 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 6,0 com

ácido clorídrico. Acrescentou-se 10 mL de glicerina (Synth), 4,6752 g de cloreto de sódio (Synth) e 4,93  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol na solução fosfato de potássio e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

#### 4.2.1.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR BRUTO

A – Efeito do tempo e velocidade de rompimento.

Diferentes velocidades (9800 a 13500rpm) do homogeneizador tipo “Bead Beater” foram testadas para a obtenção do extrato conforme descrito no item 4.2.1.A. A variação do tempo de arrebentamento (30 e 45 minutos) foi realizada para cada velocidade.

Essa padronização, foi monitorada por contagem de células utilizando-se a câmara de Neubauer. A eficiência do rompimento correspondeu ao número de células rompidas em relação ao número total de células contadas (intactas + rompidas).

B – Efeito das condições de rompimento celular em homogeneizador tipo “Bead Beater”.

Três condições de rompimento foram utilizadas:

I. Solução tampão Citrato de Sódio 2 mM, pH 6,2, contendo 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, conforme descrito por Tininis (2001): pipetou-se 2 mL da solução estoque de ácido cítrico 100 mM (descrito no item 4.2.1.A) em 80 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 6,2 com hidróxido de sódio (Synth), (em pHmetro Marconi MA 200), adicionou-se 14  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (Riedel-de Haën) e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

II. Solução tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,9, contendo 0,25 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 1mM de EDTA (Etilenodiaminotetracetato), conforme descrito por Ganzhorn et al. (1987): pesou-se 0,0035 g de Fosfato de Potássio Monobásico

(Reagen) e 0,0465 g de Fosfato de Potássio Dibásico (Reagen), dissolveu-se em 50 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 7,9 com ácido clorídrico. Acrescentou-se 1,8  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,0372 g de EDTA (Sigma nº E9884) na solução fosfato de potássio e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

III. Solução tampão Tris (hidroximetil) aminometano 100 mM, pH 8,5, contendo 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, conforme padronização no pH ótimo da ADH: pesou-se 1,2114 g de Tris (Inlab), dissolveu-se 80 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 8,5 com ácido clorídrico (Synth), adicionou-se 14  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

#### 4.2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ADH A PARTIR DE EXTRATO CELULAR BRUTO POR FRACIONAMENTO SALINO

10 g de leveduras secas de fermento de panificação Mauri (massa salgada), 100 g de pérolas de vidro (425-600 micra) e 100 mL de solução tampão citrato 2 mM, pH 6,2 contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM foram homogeneizados por 45 minutos em homogeneizador do tipo "Bead Beater". O extrato celular bruto obtido foi parcialmente purificado com modificações do procedimento proposto por Tininis (2001) como segue: o material homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos em centrifuga Incibrás (4000 rpm), modelo Spin VI, sob refrigeração. Ao sobrenadante, sob agitação (Agitador magnético Nova Técnica NT 101) em banho de gelo, foi adicionado lentamente sulfato de estreptomicina (Sigma nº S-6501) até uma concentração final de 1 %, em seguida a mistura foi mantida em geladeira por 60 minutos. Após este tempo, o material foi centrifugado por 60 minutos a 7000 rpm, e o precipitado descartado. O sobrenadante foi fracionado com sulfato de amônio sólido (Synth), triturado em almofariz, 35%-60% (de acordo com a tabela de fracionamento com sulfato de amônio sólido – DAWSON et al., 1969). O sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao sobrenadante até atingir 35% de saturação, em seguida o extrato foi deixado em repouso por 30 minutos em geladeira (4°C) e então centrifugado novamente nas condições anteriores (60 minutos/7000 rpm). O precipitado foi descartado e o sobrenadante saturado até 60% com sulfato de

amônio, adicionado lentamente sob agitação. A mistura foi então deixada em repouso em geladeira (4°C) por cerca de 12 horas e centrifugada por 60 minutos a 7000 rpm. O precipitado foi suspenso em solução tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, e levado à diálise, sob agitação e refrigeração (câmara fria), por 24 horas contra solução de ácido cítrico 0,2 mM, pH 5,5, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol (2 mM) e sulfato de manganês (10 mM), fazendo-se 3 trocas dessa solução durante as 24 horas. Ao final da diálise o extrato clarificado foi centrifugado, por 15 minutos a 7000 rpm, e depois congelado. Algumas porções foram liofilizadas por 12 horas em liofilizador Iskra MLW LGA 05.

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2: pesou-se 0,1211 g de Tris, dissolveu-se 80 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 7,2 com ácido clorídrico e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.
- Solução de ácido cítrico 0,2 mM, pH 6,2, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM e sulfato de manganês 10 mM: pipetou-se 4 mL da solução estoque de ácido cítrico 100 mM (item 4.2.1.A) em 1800 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 6,2 com hidróxido de sódio, adicionou-se 3,380 g de sulfato de manganês (Mallinckrodt), 0,280 mL  $\beta$ -mercaptoetanol e completou-se o volume para 2000 mL em balão volumétrico.

#### 4.2.3 ENSAIO ENZIMÁTICO

##### 4.2.3.1 ATIVIDADE DA ADH PELO MÉTODO ULTRAVIOLETA (UV)

O ensaio da atividade da ADH ocorreu conforme descrito por Racker (1955), baseada na conversão enzimática do etanol a acetaldeído através de reação de oxido-redução, tendo o  $\text{NAD}^+$  ( $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide) como acceptor de elétrons. A atividade do extrato frente ao etanol foi feita pela diferença da absorbância a 340 nm, por minuto, entre o ensaio e o controle correspondente. A reação foi realizada utilizando-se a seguinte mistura: 0,5 mL solução tampão pirofosfato de sódio 0,06 M, pH 8,5; 0,1 mL de etanol 3 M; 0,1 mL de  $\text{NAD}^+$  0,0015 M; 2,2 mL água; 0,1 mL de extrato enzimático parcialmente purificado diluído

em solução tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, completando um volume final de reação de 3,0 mL em cubeta de quartzo. A reação é iniciada pela adição do extrato enzimático parcialmente purificado diluído e a formação do NADH foi acompanhada espectroscopicamente a 340 nm, em UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro – Amersham Biosciences. A velocidade da reação foi medida em intervalos de 15 segundos até 90 segundos. A absorbância foi correlacionada com concentração usando-se o coeficiente de absorvidade molar do NADH de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Um controle contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o substrato, que foi substituído por água destilada, foi preparado e procedeu-se a leitura da absorbância a 340 nm de 15 em 15 segundos até 90 segundos. Os valores do ensaio controle foram subtraídos dos valores obtidos para o ensaio enzimático e as diferenças foram utilizadas para a obtenção das curvas de tempo.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que produziu 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por mL de enzima por minuto de acordo com as condições de ensaio, que foram realizados em duplicata para cada amostra. A atividade da ADH foi expressa como a quantidade de  $\text{NAD}^+$  reduzido em 1 minuto por mL de extrato e os cálculos foram obtidos utilizando-se a seguinte fórmula:

$$U/\text{mL} = \frac{\Delta A \times V \times \text{dil.}}{\Delta t \times \epsilon \times d \times v}$$

Onde:

$\Delta A$  = diferença de absorbância a 340 nm;

$V$  = volume total do ensaio (mL);

dil = diluição;

$\Delta t$  = variação de tempo (minuto);

$\epsilon$  = coeficiente de absorvidade molar do NADH;

$d$  = caminho óptico (cm);

$v$  = volume de amostra no ensaio (mL).

A atividade específica (U/mg) foi calculada através do quociente da atividade (U/mL) e pelo conteúdo protéico (mg/mL).

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução tampão pirofosfato de sódio 0,06 M, pH 8,5: pesou-se 0,1596 g de pirofosfato de sódio anidro (Synth), dissolveu-se em 8 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 8,5 com ácido clorídrico e completou-se o volume para 10 mL em balão volumétrico.
- Solução de etanol 3 M: pipetou-se 0,175 mL de álcool etílico absoluto anidro (Mallinckrodt) e completou-se o volume para 1,0 mL em balão volumétrico.
- Solução de NAD<sup>+</sup> 0,0015 M: pesou-se 0,0010 g de NAD<sup>+</sup> (Sigma nº N-7004) e dissolveu-se em 2,0 mL de água destilada. Preparou-se no instante do uso e manteve-se a solução em banho de gelo.
- Solução tampão de diluição Tris-HCl 10 mM, pH 7,2: preparou-se conforme descrito no item 4.2.2.

#### 4.2.3.2 ATIVIDADE DA ADH PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO

O ensaio da atividade da ADH foi realizado segundo descrito por Abe e Matsuki (2000) com modificações, baseado na conversão enzimática do etanol a acetaldeído, NADH e hidrogênio, onde o hidrogênio formado na presença de MTT (3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)) e PMS (Fenazina metossulfato) é transferido para produção de um produto colorido (formazona) estável e que absorve a 570 nm. A reação foi realizada usando os seguintes reagentes: 40 µL de etanol 3 M; 100 µL de NAD<sup>+</sup> na concentração de 25 mg/mL; 100 µL de MTT 600 µM dissolvido em tampão fosfato salino (PBS); 1 µL de PMS 100 µM dissolvido em PBS; 759 µL de tampão solução Tris-HCl 0,1 M a pH 8,5 contendo 1% de triton X-100. Desta mistura, 0,30 mL foram adicionados a 0,26 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M a pH 8,5 contendo 1% de triton X-100 e a reação enzimática foi iniciada com a adição de 40 µL de extrato diluído 20 vezes, seguido de uma incubação de 15 minutos a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,6 mL de uma solução 20% de dodecilsulfato de sódio (SDS) dissolvida em 50% de dimetilformamida (DMF). O branco (Br) da reação foi obtido substituindo-se o etanol por água. A coloração desenvolvida foi medida a 570 nm e 655 nm (absorbância referência), sendo a atividade da álcool desidrogenase obtida pela diferença de absorbância a

570-655 nm e do valor obtido subtraiu-se o branco. Os desvios obtidos variam entre 0,0 e 0,020 nas variações de absorvância de valores de 0,008 a 0,279.

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução de etanol 3 M: preparou-se conforme descrito no item 4.2.3.1
- Solução de NAD<sup>+</sup> 25 mg/mL: pesou-se 0,0250 g de NAD<sup>+</sup> e dissolveu-se em 1 mL de água destilada. Preparou-se no instante do uso e manteve-se a solução em banho de gelo.
- Solução de MTT 600 µM: pesou-se 0,0124 g de MTT, dissolveu-se em 40 mL de PBS, pH 7,4, e completou-se o volume com solução tampão para 50 mL em balão volumétrico. Conservou-se a solução em geladeira.
- Solução de PMS 100 µM: pesou-se 0,0031 g de PMS, dissolveu-se em 80 mL de PBS, pH 7,4, e completou-se o volume com tampão para 100 mL em balão volumétrico. Conservou-se a solução em geladeira e protegida da luz.
- Solução estoque de solução tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4: pesou-se 4,0 g de cloreto de sódio, 0,1 g de cloreto de potássio (Synth), 0,575 g de fosfato de sódio dibásico, 0,1 g de fosfato de potássio monobásico, dissolveu-se todos em 400 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 7,4 com hidróxido de sódio e completou-se o volume para 500 mL em balão volumétrico. Conservou-se a solução em geladeira.
- Solução tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo 1% de Triton X-100: pesou-se 1,2114 g de Tris, dissolveu-se 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 8,5 com ácido clorídrico. Pipetou-se, em seguida, 1,0 mL de Triton X-100 (Riedel-de Haën) e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.
- Solução de SDS 20% e de DMF 50%, pH 4,7: pesou-se 5,0 g de Dodecilsulfato de sódio (Sigma nº L4390), acrescentou-se 8 mL de água e 12,5 mL de Dimetilformamida (Synth). Dissolveu-se a solução em água fervente. Ajustou-se o pH para 4,7 com ácido clorídrico e completou-se o volume com água destilada para 25 mL em balão volumétrico.

#### 4.2.4 ENSAIO DO ETANOL

##### 4.2.4.1 ENSAIO DO ETANOL UTILIZANDO MÉTODO ULTRAVIOLETA (UV)

A determinação do etanol foi ensaiada segundo Gattás et al. (2002). O método baseia-se na conversão enzimática do álcool etílico a acetaldeído e NADH, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD<sup>+</sup> como acceptor de elétrons. A reação ocorre a pH 8,8 com o equilíbrio deslocado para a formação do acetaldeído pela reação do mesmo com semicarbazida. O Tubo R onde ocorreu a reação enzimática completa foi preparado da seguinte forma: 0,1 mL de NAD<sup>+</sup> 0,015 M; 0,04 mL de amostra (bebidas alcoólicas) diluída 2000 vezes; 3 mL de solução tampão (contendo pirofosfato de sódio 0,13 M, semicarbazida 0,079 M e glicina 0,024 M) pH 8,8; 0,1 mL de volume da preparação enzimática parcialmente purificada (0,51 U em 0,1mL) para um volume final de 3,24 mL. Uma curva padrão para a dosagem do etanol foi construída utilizando soluções de etanol em diferentes concentrações. O Tubo P diferiu do Tubo R por conter solução padrão do etanol (concentração final no Tubo R ao redor de  $6,9 \times 10^{-3} \text{ g. L}^{-1}$ ) no lugar da amostra, sendo que o Tubo Br-e foi preparado para conter água no lugar da amostra (controle da preparação enzimática). A reação enzimática foi iniciada no tempo zero com a adição da preparação enzimática e a reação procedeu por 15 min a temperatura ambiente. As diferenças entre as absorvâncias (340 nm) das soluções dos tubos R e Br-e ( $A_R - A_{Br-e}$ ), bem como, a diferença entre o Tubo P e o tubo Br-e ( $A_P - A_{Br-e}$ ) foram obtidas e utilizadas na determinação da concentração do etanol utilizando-se a seguinte equação:

$$C \text{ g/l} = \frac{(A_R - A_{Br-e})}{(A_P - A_{Br-e})} \times V \times \text{dil.} \times \frac{1}{v} \times c \times PM_{(\text{etanol})}$$

Onde:

C = concentração do etanol em g/L;

( $A_R - A_{Br-e}$ ) = Abs. amostra – Abs. branco;

( $A_P - A_{Br-e}$ ) = Abs. padrão – Abs. branco;

V = volume da reação (mL);

dil. = diluição da amostra;

v = volume da amostra (mL);

c = concentração do padrão na cubeta (M);

PM = massa molecular do etanol

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução de  $\text{NAD}^+$  0,015 M: pesou-se 0,0249 g de  $\text{NAD}^+$  e dissolveu-se em 2,5 mL de água destilada. Preparou-se no instante do uso e manteve-se a solução em banho de gelo.
- Solução tampão pirofosfato-semicarbazida-glicina, pH 8,8: pesou-se 3,4588 g de pirofosfato de sódio 0,13M, 0,8812 g de semicarbazida cloridato (Vetec) 0,079 M e 0,1802 g de glicina (Mallinckrodt) 0,024 M, dissolveu-se em 80 mL de água destilada, ajustou-se o pH para 8,8 com NaOH e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico. Preparou-se no instante do uso.

#### 4.2.4.2 ENSAIO DO ETANOL UTILIZANDO MÉTODO COLORIMÉTRICO

A determinação do etanol foi ensaiada com modificações do método descrito por Abe e Matsuki (2000). A reação do Tubo R foi realizada usando os seguintes reagentes: 100  $\mu\text{L}$  of de  $\text{NAD}^+$  na concentração de 25 mg/mL, 100  $\mu\text{L}$  de MTT 600  $\mu\text{M}$  dissolvido em PBS, 1  $\mu\text{L}$  de PMS 100  $\mu\text{M}$  dissolvido em PBS, 40  $\mu\text{L}$  de amostra (bebidas alcoólicas) diluída 20 vezes, 759  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,2 M a pH 8,5 contendo 1% de triton X-100. Desta mistura, 0,30 mL foram adicionados a 0,26 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M a pH 8,5 contendo 1% de triton X-100 onde a reação enzimática foi iniciada com a adição de 40  $\mu\text{L}$  de extrato diluído, seguido de uma incubação de 15 minutos a 50°C e a reação foi interrompida pela adição de 0,6 mL de uma solução 20% de SDS dissolvida em 50% de DMF. Uma curva padrão para a dosagem do etanol foi construída utilizando soluções de etanol em diferentes concentrações. O Tubo P diferiu do Tubo R por conter solução padrão do etanol (concentração final no Tubo R ao redor de  $23 \times 10^{-2}$  g/L) no lugar da amostra, sendo que o Tubo Br-e foi preparado para conter água no lugar da amostra (controle da preparação enzimática). As diferenças entre as absorbâncias das soluções dos tubos R e Br-e ( $A_R - A_{\text{Br-e}}$ ), bem como, a diferença entre o Tubo P e o tubo Br-e ( $A_P - A_{\text{Br-e}}$ ) foram obtidas e utilizadas na determinação da concentração do etanol utilizando-se a equação do item 4.2.4.1.

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução de Etanol 3 M, de  $\text{NAD}^+$  25 mg/mL, de MTT 600  $\mu\text{M}$ , de PMS 100  $\mu\text{M}$ , solução estoque PBS, pH 7,4, de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo 1% de triton X-100, de SDS 20% e de DMF 50%, pH 4,7: preparou-se conforme descrito no item 4.2.3.2.

#### 4.2.5 ESTABILIDADE DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)

##### 4.2.5.1 ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica da álcool desidrogenase foi determinada após a incubação da enzima, obtida como descrito no item 4.2.1.B, por 1 hora a temperaturas de 0, 30, 40, 50, 60, 70°C, através de medidas de atividade da ADH.

##### 4.2.5.2 ESTABILIDADE A DIFERENTES pHs

A estabilidade da álcool desidrogenase foi determinada em diferentes pHs (solução tampão acetato 0,1 M: pH 4 e 5; solução tampão fosfato de sódio 0,1 M: pH 6 e 7; solução tampão Tris-HCl 0,1 M: pH 8-10) por até 217 horas a partir de preparações enzimáticas obtidas como descrito no item 4.2.1.B. O extrato celular foi alíquotado e diluído nos diferentes tampões.

##### 4.2.5.3 ESTABILIDADE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE ESTOCAGEM

A estabilidade da álcool desidrogenase foi determinada em diferentes temperaturas (-18° C, +4° C e +30° C) por até 12 meses e na presença de estabilizantes a partir de preparações enzimáticas parcialmente purificadas obtidas como descrito no item 4.2.2. O extrato celular foi dividido e estabilizantes foram adicionados como: polietileno glicol 15% (PEG) 3350, azida de sódio 1 mM e cloreto de zinco 10  $\mu\text{M}$ , um controle (sem adição de estabilizantes) foi também preparado para posterior liofilização.

Após a liofilização, por 12 horas, as preparações enzimáticas na presença ou não de estabilizantes foram armazenadas em B.O.D (+30°) e em geladeira (+4° C). A preparação enzimática armazenada em freezer (-18° C) não foi liofilizada.

#### 4.2.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura foi determinado utilizando o método de Lowry modificado por Layne (1957), tendo albumina de soro bovino como padrão e utilizando as seguintes soluções:

- ✓ Solução A: 10 mL de carbonato de sódio 20% acrescido de 10 mL de hidróxido de sódio 1 M;
- ✓ Solução B: 1 mL de sulfato de cobre 5% acrescido de 1 mL de tartarato de sódio e potássio 10%;
- ✓ Solução C: solução A acrescido de 2 mL da solução B e água destilada para volume final de 100 mL.

No ensaio a seguinte mistura de reação foi preparada e incubada: 1 mL de amostra diluída e 6 mL da solução C foram misturados e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir adicionou-se 0,58 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada em proporção de 1:2) e esperou-se mais 30 minutos para realizarem-se as leituras à 600nm.

Uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 0,06% ou 0,6 mg/mL foi preparada para estoque. Frações da solução padrão foram armazenadas em congelador (porções de 0,5 mL) e ensaiadas em duplicata para cada ensaio (0,3 mL da solução padrão completada para 1,0 mL com água destilada). O branco (Br) da reação obtém-se substituindo a amostra por água. O cálculo de proteína total, expresso em mg proteínas/mL, foi calculado através da seguinte fórmula:

$$Cp = \frac{A(\text{amostra}) - A(\text{Br})}{A(\text{padrão}) - A(\text{Br})} \times \text{dil.} \times a$$

Onde:

A (amostra) = absorbância da amostra;

A (Br) = absorbância do branco;

A (padrão) = absorbância do padrão;

dil. = diluição;

a = absortividade (0,18 mg mL<sup>-1</sup>).

A atividade específica foi calculada através do quociente da atividade (U/mL) e pelo conteúdo protéico (mg/mL), sendo expressa, portanto, em U/mg.

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES:

- Solução de carbonato de sódio 20%: pesou-se 2,0 g de carbonato de sódio anidro (Synth) e dissolveu-se em 10,0 mL de água destilada.
- Solução de hidróxido de sódio 1 M: pesou-se 4,0 g de hidróxido de sódio e dissolveu-se em 100,0 mL de água destilada.
- Solução de sulfato de cobre 5%: pesou-se 0,5 g de sulfato de cobre (CRQ) e dissolveu-se em 10,0 mL de água destilada.
- Solução de tartarato de sódio e potássio 10%: pesou-se 1,0 g de tartarato de sódio e potássio (Merck) e dissolveu-se em 10,0 mL de água destilada.
- Solução de soro albumina bovina 0,06% ou 0,6 mg/mL: pesou-se 0,006 g de BSA (Inlab) e dissolveu-se em 10,0 mL de água destilada.

#### 4.2.7 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO

Os ensaios de recuperação do etanol foram realizados em amostra de vinho com a adição de etanol (50 e 100 g/L) para determinações de etanol usando as metodologias com leituras no UV (340 nm) e visível (570-655 nm).

#### 4.2.8 DESVIOS

Os desvios obtidos, conforme descrito por Goldemberg (1968), variam entre 0,001 e 0,059 nos cálculos da atividade de ADH com determinações realizadas em duplicatas para valores de atividade de ADH 0,144 a 2,71 U/mg.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados em etapas:

- Otimização das condições de extração e purificação parcial da álcool desidrogenase (ADH).
- Ensaio enzimático da atividade da ADH e curva analítica de etanol no UV
- Estudos da estabilidade da álcool desidrogenase (ADH).
- Padronização do ensaio colorimétrico da atividade da ADH e do etanol.
- Determinação do etanol em diferentes bebidas alcoólicas através das metodologias ultravioleta (UV) e colorimétrica.

## **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH).**

Na otimização da extração da ADH, o estudo das condições de arrebentamento celular, tais como: forma de rompimento celular e escolha da solução tampão no rompimento serão apresentados nas Tabelas 1-3 e os estudos de purificação da enzima serão mostrados nas Tabelas 4 e 5.

### **5.1 ROMPIMENTO DA PAREDE CELULAR PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO RICO EM ATIVIDADE DE ADH**

Três ensaios de rompimento celular da levedura de panificação foram utilizados para obter o extrato celular bruto rico em ADH, a ser utilizado no ensaio enzimático no UV e no colorimétrico. No processo de rompimento em homogeneizador do tipo “Bead Beater”, obteve-se a maior atividade (7,81 U/mL) da álcool desidrogenase (ADH) no extrato bruto, seguido pelo rompimento celular com o agitador de tubo da marca Phoenix (5,66 U/mL), como pode ser verificado na **Tabela 1**. Comparando-se os níveis de atividade de ADH presente nos extratos lisados, obtidos através dos diferentes processos de rompimento, verifica-se que o processo de extração no homogeneizador tipo “Bead Beater” foi mais eficiente do que o processo de areia em almofariz, com um aumento na atividade da enzima de 5,58 vezes entre o procedimento “Bead Beater” e areia em almofariz.

**Tabela 1** – Comparação dos processos de rompimento celular para obtenção do extrato bruto contendo ADH.

Processo de arrebentamento celular	Atividade ADH (U/mL)	Relativo (%) <sup>(a)</sup>
Homogeneizador tipo “Bead Beater”	7,81	100,0
Trituração com areia em almofariz	1,40	17,93
Agitador de tubo Phoenix	5,66	72,47
Agitador de tubo Marcone	3,58	45,84

(a) Em relação à atividade do extrato bruto obtido pelo homogeneizador tipo “Bead Beater”

## 5.2 TEMPO E VELOCIDADE DE ROMPIMENTO CELULAR PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO

A eficiência do rompimento celular usando o homogeneizador do tipo “Bead Beater”, experimentando diversas velocidades de agitação na presença de micro pérolas de vidro (“glass bead” - diâmetro de 0,5 mm) foi medida através da contagem de célula de levedura em câmara de Neubauer.

A **Tabela 2** mostra os resultados da eficiência do arrebetamento celular conforme a variação na velocidade do aparelho, homogeneizador do tipo “Bead Beater”, e o tempo de rompimento. A velocidade 4 (13500 rpm) durante 45 minutos foi a condição ideal e selecionada com uma eficiência de arrebetamento de 50,7%.

**Tabela 2** – Eficiência no rompimento celular utilizando o aparelho tipo “Bead Beater”.

Velocidade	Eficiência (%) <sup>(a)</sup>	
	30 (min)	45 (min)
2 (9800 rpm)	7,83	36,1
3 (11800 rpm)	14,2	45,2
4 (13500 rpm)	32,0	50,7

(a) Número de células rompidas em relação ao número total de células contadas (intactas + rompidas).

## 5.3 ROMPIMENTO CELULAR PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO EM DIFERENTES TAMPÕES

Realizaram-se ensaios de atividade da ADH em meio contendo diferentes soluções tampões: citrato de sódio 2 mM, fosfato de potássio 50 mM e Tris-HCl 100 mM, em diferentes valores de pH. Em todas as soluções foram adicionados 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

O tampão citrato de sódio 2 mM contendo 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol foi padronizado por Tininis (2001) no procedimento de rompimento celular usando

“Bead Beater”, para obtenção de preparação enzimática rica em glicerol fosfato desidrogenase.

A **Tabela 3** mostra os resultados de atividade de ADH do extrato celular em diferentes soluções tampão. A solução tampão citrato de sódio 2 mM contendo 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol foi a melhor no rompimento celular da levedura.

**Tabela 3** – Efeito dos componentes, da concentração e do valor do pH da solução tampão no rompimento sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) utilizando aparelho tipo “Bead Beater”.

Solução Tampão			Atividade da ADH	
Componentes	Concentração	pH	(U/mL)	(U/mg)
Citrato de sódio + 2 mM de $\beta$ - mercaptoetanol <sup>(a)</sup>	2 mM	6,2	7,24	0,88
Fosfato de potássio + 0,25 mM de $\beta$ - mercaptoetanol <sup>(b)</sup>	50 mM	7,9	5,02	0,46
Tris-HCl + 2 mM de $\beta$ - mercaptoetanol <sup>(c)</sup>	100 mM	8,5	5,79	0,25

Referências: (a) Tininis (2001); (b) Ganzhorn et al. (1987); (c) padronização no pH ótimo da ADH.

#### 5.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ADH

O fracionamento salino é uma técnica de concentração de enzima, que permite a separação seletiva de proteínas através da neutralização de cargas, com resultados de purificação de até no máximo 5 vezes (TININIS, 2001). A metodologia descrita por Scopes (1993) utiliza precipitação com sulfato de estreptomicina e sulfato de protamina para clarificação do extrato, com a retirada dos ácidos nucleicos da preparação bruta.

O extrato celular bruto, obtido de acordo com o item 4.2.1.A, foi precipitado com sulfato de estreptomicina e sulfato de amônio em diferentes pontos de saturação (35, 40, 50, 60, 70 e 80%), conforme descrito por Englard e Seifter (1990).

A atividade da enzima álcool desidrogenase e o conteúdo protéico dos extratos celulares foram determinados nos diferentes pontos de fracionamento salino com sulfato de amônio e os resultados obtidos são mostrados na **Tabela 4**. Na **Tabela 4**, observa-se que o precipitado do fracionamento com 60% de saturação apresentou maior atividade da ADH. A atividade da ADH presente nos sobrenadantes das centrifugações é continuamente decrescente.

O objetivo da purificação da ADH neste trabalho foi obter uma preparação enzimática com um nível de ADH que permitisse quantificar o álcool etílico em diferentes amostras de bebidas. A purificação servirá para reduzir interferências nas leituras espectrofotométricas.

**Tabela 4** – Determinação da atividade enzimática da ADH nas diferentes etapas de fracionamento salino com sulfato de amônio.

Saturação com Sulfato de Amônio (%)	Sobrenadante			Precipitado		
	Atividade (U/mL)	C <sub>proteína</sub> (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade (U/mL)	C <sub>proteína</sub> (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Extrato bruto	7,52	9,95	0,756	-	-	-
35	8,68	9,35	0,928	0,320	1,58	0,203
40	9,26	8,95	1,04	1,07	1,77	0,605
50	6,95	6,83	1,02	10,7	5,54	1,93
60	2,75	4,67	0,589	30,1	11,1	2,71
70	0,230	1,60	0,144	9,41	5,39	1,75
80	0,00	0,870	0,00	2,61	5,27	0,495

A **Tabela 5** resume as etapas da purificação parcial do extrato celular bruto de levedura de panificação. Observa-se que houve um aumento de 3,69 vezes na atividade da álcool desidrogenase, em relação ao extrato bruto, após o fracionamento salino (35-60% de saturação) com sulfato de amônio.

**Tabela 5** – Etapas da purificação da ADH

Etapas da Purificação <sup>(a)</sup>	Volume (mL)	Rendimento		C <sub>proteína</sub> (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
		(U)	(%)			
Extrato Bruto	64,0	472,32	100	666,88	0,708	1,00
sulfato de estreptomicina	52,0	299,00	63,3	574,60	0,520	0,730
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (sobrenadante) 0-35%	51,0	410,55	86,9	542,13	0,757	1,07
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (precipitado) 35-60% <sup>(b)</sup>	5,30	158,74	33,6	60,740	2,61	3,69

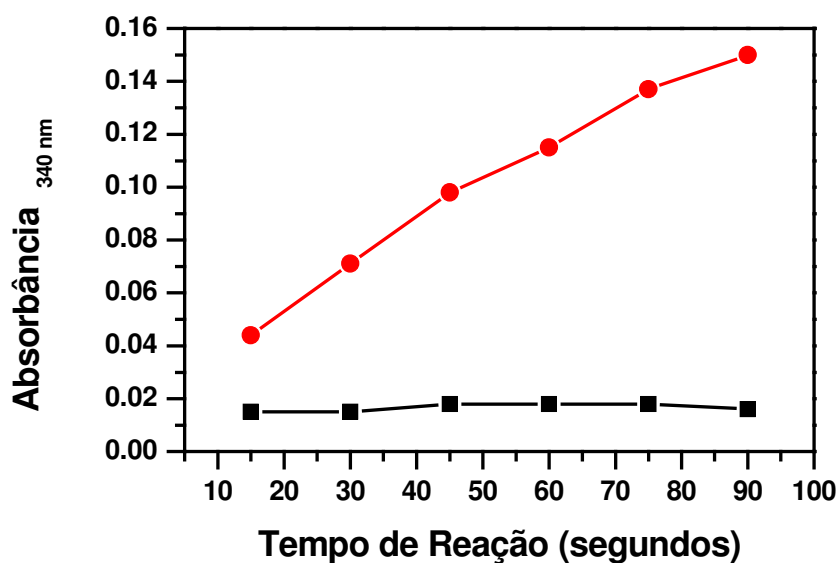
<sup>(a)</sup> Todas as frações foram dialisadas, sob agitação e refrigeração (câmara fria), contra solução de solução de ácido cítrico 0,2 mM, pH 5,5, contendo β-mercaptoetanol 2 mM e sulfato de manganês 10 mM, por 24 horas fazendo-se 3 trocas da solução.

<sup>(b)</sup> Após dissolução do precipitado em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2.

## ENSAIO ENZIMÁTICO DA ATIVIDADE DA ADH E CURVA ANALÍTICA DE ETANOL NO UV

### 5.5 ATIVIDADE DA ADH PELO MÉTODO ULTRAVIOLETA (UV)

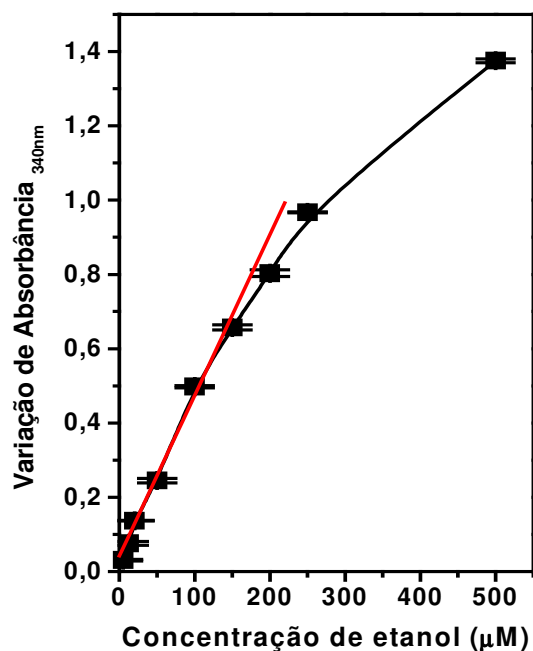
O ensaio da atividade da ADH ocorreu conforme descrito por Racker (1955), baseada na conversão enzimática do etanol a acetaldeído através de reação de óxido-redução, tendo o  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide adenine dinucleotide) como aceptor de elétrons. A atividade do extrato frente ao etanol foi feita pela diferença da absorbância a 340 nm, por minuto, entre o teste e o controle correspondente, como pode ser observado na **Figura 1**.



**Figura 1** – Variação da velocidade de formação de NADH em função do tempo de reação. (●) Teste e (■) Branco.

### 5.6 CURVA ANALÍTICA DE DOSAGEM DE ETANOL – MÉTODO ULTRAVIOLETA

O método apresentou sensibilidade na faixa de 5  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$  no tubo de dosagem, após 15 minutos de reação, como mostrado na **Figura 2**, o que equivale a soluções padrões do etanol na faixa de  $2,3 \times 10^{-4}$  g/L a  $6,91 \times 10^{-3}$  g/L.



**Figura 2** – Curva analítica do etanol obtida com a preparação enzimática parcialmente purificada da ADH (fração precipitada entre 35-60% de saturação salina). Condição do ensaio: solução tampão (contendo pirofosfato de sódio 0,13 M, semicarbazida 0,079 M e glicina 0,024 M) pH 8,8;  $\text{NAD}^+$  0,015 M; etanol (5 a 500  $\mu\text{M}$ ) e o extrato enzimático parcialmente purificado e diluído.  $R^2$  0,98881.

## **ESTABILIDADE DA ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)**

A proposta de uma metodologia de dosagem requer conhecimento prévio da estabilidade da enzima nas diferentes condições de estocagens. Foram testadas diferentes temperaturas de estocagem da ADH, a saber: temperatura de 30°C, 4°C (geladeira) e -18°C (freezer), por até 12 meses.

Estabilizantes (PEG e BSA) e azida de sódio foram adicionados, separadamente na amostra, no tempo inicial.

### **5.7 PRESENÇA DE ADITIVOS DURANTE ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE DA ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.**

#### **A- Amostra reconstituída em soluções de aditivos de estabilização**

A literatura mostra que azida de sódio adicionada sobre extrato enzimático atua na preservação de atividade de ADH por ser inibidor de atividade de outras enzimas (LESKOVAC, 1998). Foram testados, também, estabilizantes como albumina de soro bovino e o polietileno glicol (PEG). Estas substâncias foram adicionadas na tentativa de determinar a melhor forma de preservação da atividade da ADH, em diferentes temperaturas, por um maior tempo de estocagem.

As soluções de azida de sódio na concentração de 1 mM e, os estabilizantes como a soro albumina bovina (BSA) na concentração de 1% e o polietileno glicol 3350 (PEG), nas concentrações de 5% e 15% foram adicionados à preparação enzimática, após a liofilização, e estocada em geladeira (4°C) por 15 dias, dados apresentados na **Tabela 6**.

A queda na atividade da ADH é muito acentuada na presença de 1% de BSA, representando 93,4%, após 15 dias de estocagem à 4°C. Porém, a maior queda de atividade da enzima, mantida nesta temperatura, deu-se na presença de 5% de PEG (97,8%) após o mesmo período de tempo de estocagem. A manutenção da ADH na temperatura de 4°C, durante 5 dias e na presença de 1 mM de azida de sódio indicou queda de atividade de apenas 21,5% (**Tabela 6**), entretanto, este ensaio mostrou que não é necessário a adição destes conservantes durante a estocagem, por até 5 dias, a 4°C.

**Tabela 6** – Efeito da adição da azida de sódio 1 mM, PEG 5 e 15% e soro albumina bovina 1%, sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) estocada em geladeira (4°C).

Tempo de estocagem	Atividade da ADH (U/mL)				
	Controle	Azida de sódio 1 mM	PEG 5%	PEG 15%	BSA 1%
	Inicial	29,52	28,94	28,65	28,87
1 dia	23,40	22,73	25,79	27,45	26,40
5 dias	22,14	22,73	9,660	10,75	9,750
7 dias	18,32	15,50	7,280	8,950	8,430
10 dias	9,160	8,780	6,770	8,350	7,970
15 dias	2,040	3,110	0,6300	2,340	1,860

A **Tabela 7** mostra o efeito de aditivos de estabilização, azida de sódio 1 mM e do PEG 15%, sobre a atividade da ADH durante 12 meses de estocagem em freezer (-18°C). A preparação enzimática pode ser mantida por mais de 12 meses em freezer, sem perda total de atividade.

A álcool desidrogenase mostrou sensibilidade à forma de estocagem. A enzima congelada na presença destes conservantes de atividade mostrou baixa estabilidade em relação à enzima liofilizada junto com os conservantes. Estes ensaios, importantes para montagem de um “kit” de dosagem, deverão ter continuidade no nosso laboratório, com a experimentação de outras substâncias.

**Tabela 7** – Efeito da adição de aditivos de estabilização sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) durante estocagem em freezer (-18°C).

Tempo de estocagem	Controle		Azida de Sódio 1 mM		PEG15%	
	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Inicial	30,1	0,84	29,9	0,77	29,4	1,1
3 dias	26,2	0,79	22,5	0,69	25,5	1,0
7 dias	16,9	0,57	17,6	0,60	17,6	0,87
15 dias	15,4	0,53	15,4	0,54	15,4	0,86
1 mês	15,0	0,52	14,6	0,51	15,4	0,88
2 meses	14,6	0,53	13,1	0,46	14,6	0,87
3 meses	13,9	0,51	13,1	0,47	14,3	0,84
4 meses	13,1	0,50	13,0	0,46	14,3	0,84
5 meses	12,4	0,47	13,0	0,42	13,5	0,82
6 meses	12,0	0,47	12,4	0,41	13,5	0,82
7 meses	11,3	0,46	12,4	0,40	13,2	0,83
8 meses	11,7	0,44	11,0	0,47	11,9	0,72
9 meses	9,53	0,37	8,66	0,37	9,53	0,63
10 meses	9,96	0,44	8,87	0,39	8,87	0,64
11 meses	5,63	0,35	5,63	0,35	5,63	0,47
12 meses	4,22	0,25	4,44	0,27	4,44	0,43

### **B – Amostra liofilizada na presença de aditivos de estabilização**

A liofilização é um dos processos mais utilizados na preservação das proteínas. A utilização de 15% (p/v) de PEG 4000 foi suficiente para preservar 75%

da atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase de preparações enzimáticas obtidas de leveduras de panificação, estocadas a 4°C por 7 dias (TININIS, 2001).

Neste ensaio, a preparação enzimática foi liofilizada na presença dos aditivos: azida de sódio 1 mM, PEG 15% e cloreto de zinco 10 µM. A estocagem foi realizada a 30°C e 4°C por até 30 dias.

A **Tabela 8** mostra os resultados de atividade da ADH durante 30 dias de estocagem a temperatura de 30°C, na presença dos aditivos citados acima. A adição de PEG 15%, antes da liofilização da preparação enzimática, manteve a atividade da ADH (cerca de 66%) por 25 dias, seguido pela azida de sódio (57%) e do cloreto de zinco (16%).

**Tabela 8** – Efeito da adição de aditivos sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) estocada a 30°C.

Tempo de estocagem	Atividade da ADH (U/mL)			
	Controle	Azida de Sódio 1mM	PEG 15%	Cloreto de Zinco 10 µM
Inicial	29,30	28,65	28,36	28,36
1 dia	24,06	28,65	28,36	28,36
5 dias	24,06	28,65	28,36	28,36
10 dias	21,98	28,65	28,36	28,36
15 dias	10,47	23,45	22,46	10,21
17 dias	7,850	22,15	21,28	7,660
20 dias	5,750	20,84	18,91	6,800
25 dias	5,500	16,29	18,62	5,660
30 dias	2,620	11,73	13,31	4,550

O acompanhamento da atividade da ADH liofilizada em geladeira, na presença dos estabilizantes azida de sódio 1 mM, PEG 15% e cloreto de zinco

10  $\mu\text{M}$  é observado na **Tabela 9**. Verifica-se que ocorreu uma ação efetiva destes estabilizantes sobre a preservação da atividade enzimática. A adição de 1 mM de azida de sódio permitiu a manutenção de 96,2% da atividade da ADH por 60 dias a 4°C, enquanto 15,7% de inativação da ADH foi observada na presença de 15% de PEG e 10  $\mu\text{M}$  de cloreto de zinco, no mesmo período de tempo e temperatura.

**Tabela 9** – Efeito da adição de aditivos sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH) estocada em geladeira (4°C).

Tempo De Estocagem	Atividade da ADH (U/mL)			
	Controle	Azida de Sódio 1mM	PEG 15%	Cloreto de Zinco 10 $\mu\text{M}$
Inicial	29,30	28,65	28,36	28,36
1 dia	25,53	27,55	26,17	27,27
7 dias	25,53	27,55	26,17	25,08
15 dias	25,53	27,55	25,08	25,08
30 dias	25,53	27,55	23,99	23,99
60 dias	23,63	27,55	23,99	23,99

## **PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DA ATIVIDADE DA ADH E DO ETANOL**

Preparações enzimáticas ricas em álcool desidrogenase, a partir de levedura seca de panificação foram obtidas, como descrito por Gattás e Peres (2003), e utilizadas na padronização do ensaio enzimático colorimétrico como se observa nas tabelas (10 - 13) e figuras (3 - 13).

### 5.8 EFEITO DO TAMPÃO NO PREPARO DOS REAGENTES DE COR

Abe e Matsuki (2000) utilizaram reagentes de cor MTT e PMS dissolvidos em tampão fosfato salino (PBS) nos ensaios de atividade da lactato desidrogenase, como indicativos de viabilidade celular. A **Tabela 10** mostra os resultados de absorvância dos ensaios realizados no meio água e meio PBS. No ensaio que utiliza solução salina de PBS a atividade da ADH foi 2,6 vezes superior e esta condição foi utilizada nos demais ensaios.

**Tabela 10** – Comparação da adição do MTT e PMS preparados em água ou tampão salino (PBS).

Condição de ensaio	$\Delta A_{570-655 \text{ nm}}$ Teste	$\Delta A_{570-655 \text{ nm}}$ Branco	$\Delta A_{570-655 \text{ nm}}$ Teste – Branco
MTT 600 $\mu\text{M}$ e PMS 100 $\mu\text{M}$ em água	0,233	0,224	$0,90 \times 10^{-2}$
MTT 600 $\mu\text{M}$ e PMS 100 $\mu\text{M}$ em solução tampão PBS	0,239	0,215	$2,4 \times 10^{-2}$

### 5.9 CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES NO ENSAIO

Os resultados da variação da absorvância da ADH em função da concentração de MTT,  $\text{NAD}^+$  e PMS são mostrados na **Tabela 11**.

A adição de 0,015 mM do MTT na reação mostrou uma elevação da capacidade do extrato bruto em reduzir o NAD<sup>+</sup> a custa da oxidação do etanol em 1,45 vezes. Portanto, a adição de 0,015 mM de MTT na presença de 0,31 M de NAD<sup>+</sup> e 0,013 mM de PMS elevou a atividade da enzima em 0,014 unidades de absorbância, como se observa na **Tabela 11**.

O aumento da concentração do NAD<sup>+</sup> para 0,62 M, mantendo-se o MTT em 0,015 mM e o PMS em 0,013 mM ativou a ADH em 6,03 vezes e esta foi a condição ideal para o ensaio. Por outro lado, o aumento do PMS foi inibitório acima de 0,013 mM indicando que está fora da sua concentração ótima.

A condição ideal da mistura de reação foi: MTT na concentração de 0,015 mM, NAD<sup>+</sup> na concentração de 0,62 M e PMS na concentração de 0,013 mM.

**Tabela 11** – Efeito da concentração do MTT, NAD<sup>+</sup> e PMS na reação sobre a atividade da álcool desidrogenase (ADH).

Reagentes			Atividade da ADH	
MTT (mM)	NAD <sup>+</sup> (M)	PMS (mM)	$\Delta A_{570-655 \text{ nm}}$	Relativa
Controle	0,31	0,052	0,031	1,00
0,015	0,31	0,013	0,045	1,45
0,015	0,31	0,052	0,068	2,23
0,015	0,62	0,052	0,141	4,55
<b>0,015</b>	<b>0,62</b>	<b>0,013</b>	<b>0,187</b>	<b>6,03</b>
0,015	0,62	0,00	0,008	0,260

#### 5.10 ADIÇÃO DE METAIS SOBRE A ATIVIDADE DA ADH

O efeito da adição de sais sobre a atividade da ADH foi determinado utilizando diferentes compostos salinos, na concentração final no ensaio de 2 mM, como pode ser observado na **Tabela 12**. A adição do metal sulfato de alumínio e potássio ativou a ADH em 3,87 vezes, enquanto que o sulfato de cobre inibiu

completamente a reação. A adição dos metais óxido de zinco e sulfato de ferro II, na concentração usada, inviabilizaram o ensaio (formação de precipitado).

Adições de íons no ensaio da ADH fez melhorar a atividade da enzima na seguinte ordem:  $Al^{+++}$  e  $K^+ > NH_4^+ > Na^+ > K^+ > Ca^{++} = Mg^{++} > Mn^{++} > Cd^+$ . O acompanhamento da conversão do etanol a acetaldeído, catalisada pela ADH, seguida das reações de oxido-redução do  $NAD^+$  a  $NADH$  e MTT a MTT formazona, tendo o PMS como acceptor de elétrons, consiste numa metodologia de dosagem de consumo de etanol, com diversas aplicações na área de alimentos e bebidas. A desvantagem desta metodologia é atribuída a baixa solubilidade do MTT em meio aquoso (ABE e MATSUKI, 2000).

**Tabela 12** – Efeito da adição de sais (2 mM) no ensaio enzimático da álcool desidrogenase (ADH) presente no extrato celular bruto.

Sais Metálicos (2 mM)	Atividade da ADH	
	$\Delta A_{570-655 \text{ nm}}$	Relativa
Controle (sem metal)	0,033	100,00
Cloreto de cálcio	0,061	184,85
Cloreto de potássio	0,079	239,40
Óxido de zinco*	-	-
Sulfato de alumínio e Potássio	0,128	387,88
Sulfato de Amônio	0,096	290,91
Sulfato de Cádmió	0,008	24,240
Sulfato de Cobre	0,0	0,0
Sulfato de Ferro II*	-	-
Sulfato de Magnésio	0,061	184,85
Sulfato de Manganês	0,015	45,460
Sulfato de Sódio	0,088	266,67

\* não foi possível quantificar

### 5.11 ADIÇÃO DE TRITON X-100 NO ENSAIO

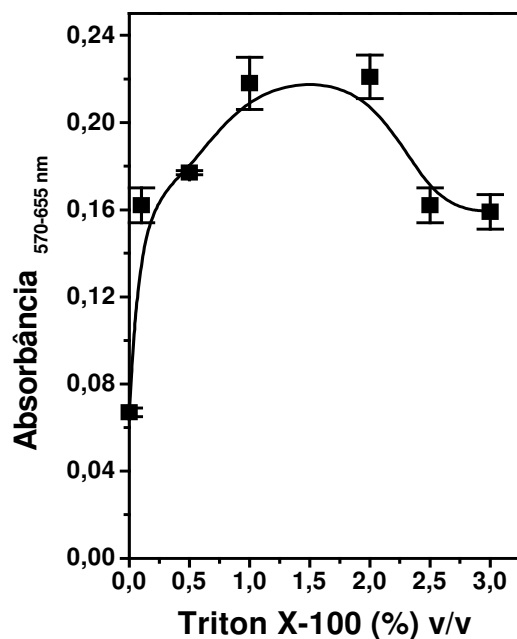
Os autores Abe e Matsuki (2000) descrevem um aumento de atividade para a lactato desidrogenase, quando triton X-100 foi adicionado ao ensaio. Verificou-se o efeito da adição desse detergente na reação de dosagem de atividade da ADH, na presença e ausência de sulfato de alumínio e potássio, como pode ser observado na **Tabela 13**. A adição de triton X-100 0,1% no ensaio enzimático da ADH fez aumentar o nível de atividade da enzima em 69,5%. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi encontrada nas leituras de absorbâncias dos ensaios com sulfato de alumínio e potássio e triton X-100 0,1%. Portanto, o triton X-100, adicionado no ensaio na concentração de 0,1% é o responsável pela ativação da ADH.

A otimização da concentração de triton X-100 no ensaio de atividade da ADH de levedura de panificação foi a próxima etapa do trabalho.

**Tabela 13** – Efeito da adição de triton X-100 no ensaio da ADH presente no extrato celular bruto.

Adição no Ensaio	Atividade da ADH	
	$\Delta A_{570-655 \text{ nm}}$	Relativa
Controle (sem triton e sem sal metálico)	0,033	100,00
Triton X-100 0,1%	0,160	484,85
Sulfato de alumínio e Potássio 2 mM	0,128	387,88
Triton X-100 0,1% + Sulfato de Alumínio e Potássio 2 mM	0,172	521,21

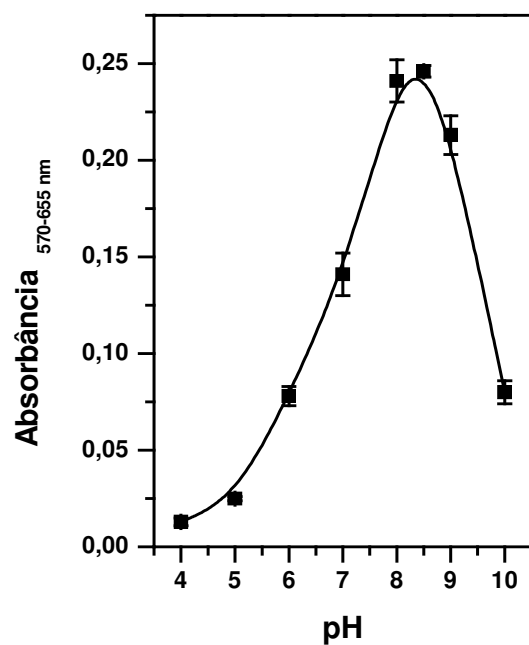
O efeito da concentração de triton X-100 sobre a atividade da ADH é mostrado na **Figura 3**. Observa-se que a maior atividade da enzima é conseguida na presença de triton X-100 na faixa de 1 e 2 %. A adição de triton X-100 na concentração de 1% foi fixada para os próximos ensaios.



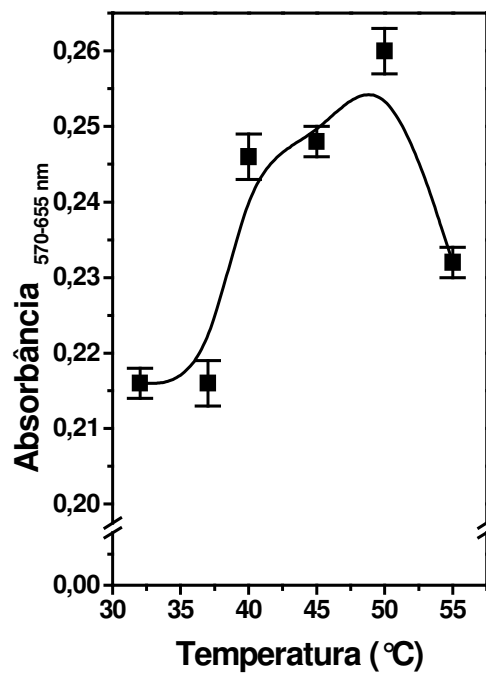
**Figura 3** – Efeito de concentração de triton X-100 no ensaio de dosagem da ADH.

#### 5.12 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NO ENSAIO

A curva de pH e a curva de temperatura (**Figuras 4 e 5**), para o ensaio da atividade da álcool desidrogenase foram traçadas e o pH ótimo de 8,5 e a temperatura ótima de 50°C foram determinados. O pH e a temperatura ótimos encontrados coincidem com os valores da literatura (RACKER, 1955; MARTOADIPRAWITO, 1963; PESSIONE et al., 1990; OKUMA, ITO e ENDO, 1991). Entretanto, o valor de pH ótimo de 8,1 e a temperatura ótima de 35°C foram mostrados por Svensson et al. (2005), que desenvolveram um método de determinação de etanol utilizando álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* e um sistema de biosensor para acompanhar as leituras.



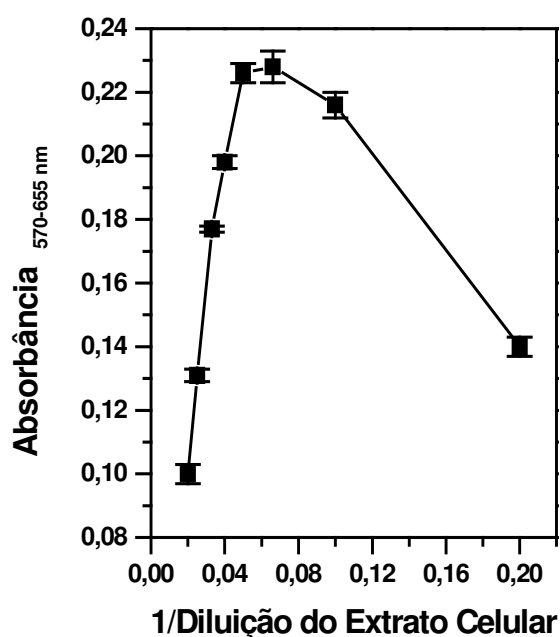
**Figura 4** – Determinação do pH ótimo no ensaio de dosagem da ADH.



**Figura 5** – Determinação da temperatura ótima no ensaio de dosagem da ADH.

### 5.13 EFEITO DA DILUIÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO SOBRE A ATIVIDADE DA ADH

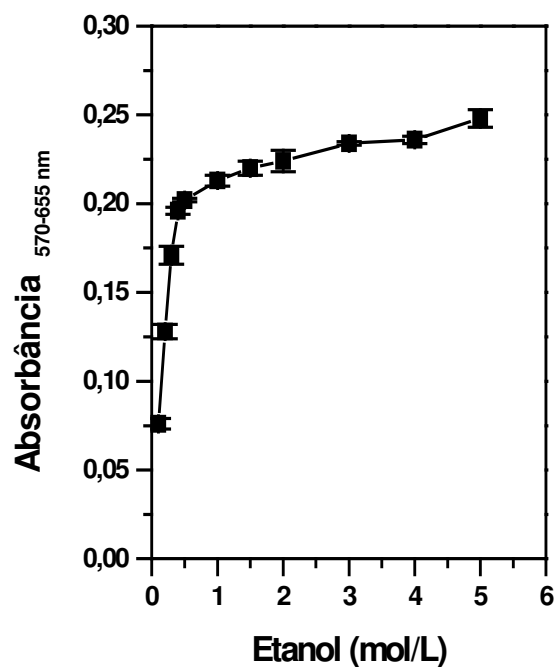
A **Figura 6** mostra a curva que correlaciona as absorbâncias resultantes da atividade da ADH, presente no extrato celular, em função da diluição da enzima. A diluição da enzima durante o ensaio da atividade não deve ser menor que 20 vezes, pois a partir desse ponto não existe uma correlação linear entre absorbância e diluição do extrato celular.



**Figura 6** – Efeito de diluição do extrato celular no ensaio de dosagem da ADH.

### 5.14 CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO (ETANOL) NA ATIVIDADE DA ADH

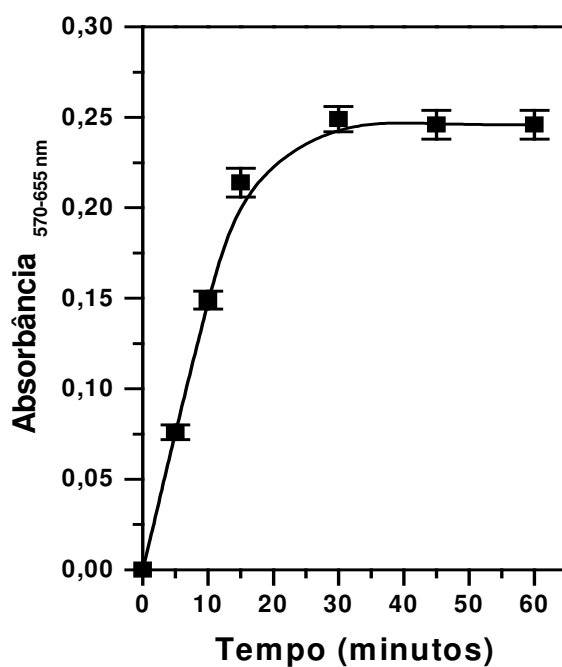
O efeito da concentração de substrato na velocidade da reação foi máxima quando se utiliza etanol na concentração de 3 mol/L (**Figura 7**).



**Figura 7** – Efeito de concentração de etanol no ensaio de dosagem da ADH.

#### 5.15 CURVA DE TEMPO SOBRE A ATIVIDADE DA ADH

A **Figura 8** mostra a curva que correlaciona as absorvâncias resultantes da atividade, presente no extrato celular diluído 20 vezes, em função do tempo. O tempo de incubação durante o ensaio da atividade não deve ser maior que 15 minutos, pois a partir desse ponto, não existe uma correlação linear entre absorvância e tempo de reação.

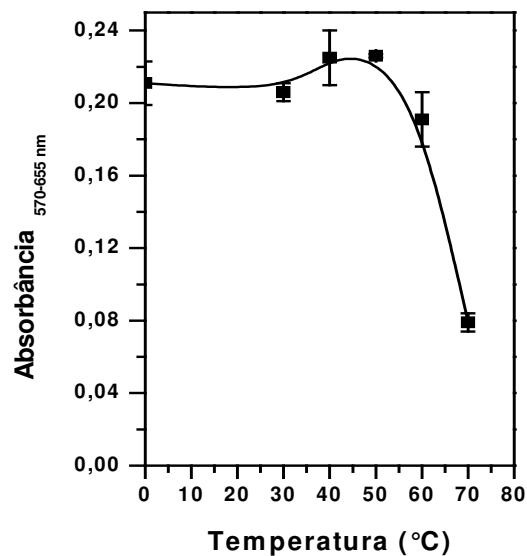


**Figura 8** – Atividade da ADH em função do tempo de ensaio.

#### 5.16 ESTABILIDADE TÉRMICA A DIFERENTES VALORES DE pHs SOBRE A ATIVIDADE DA ADH

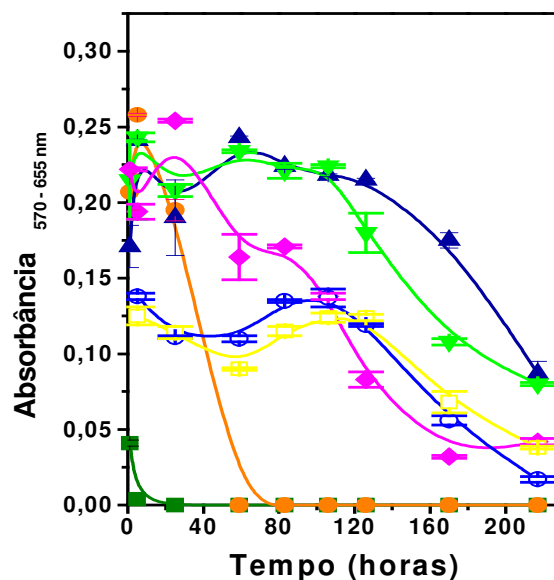
Preparações enzimáticas, obtidas a partir de levedura seca de panificação como descrito no item 4.2.1.B, foram analisadas quanto à estabilidade a diferentes temperaturas e pH.

A estabilidade térmica foi determinada através de medidas de absorbância após incubação da enzima por 1 hora a temperaturas de 0, 30, 40, 50, 60, 70°C como mostra a **Figura 9**. Os resultados obtidos mostraram que a enzima apresentou uma estabilidade térmica, até 50°C e que, após este valor a atividade decresce.



**Figura 9** – Estabilidade térmica da ADH.

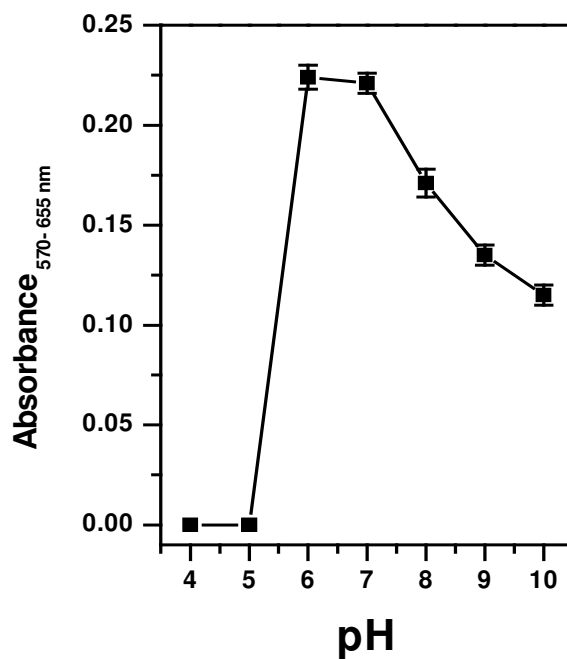
Em relação ao pH (tampão acetato 0,1 M: pH 4 e 5; tampão fosfato de sódio 0,1 M: pH 6 e 7; tampão Tris-HCl 0,1 M: pH 8-10) determinou-se a absorbância durante 217 horas a temperatura ambiente como mostra a **Figura 10**.



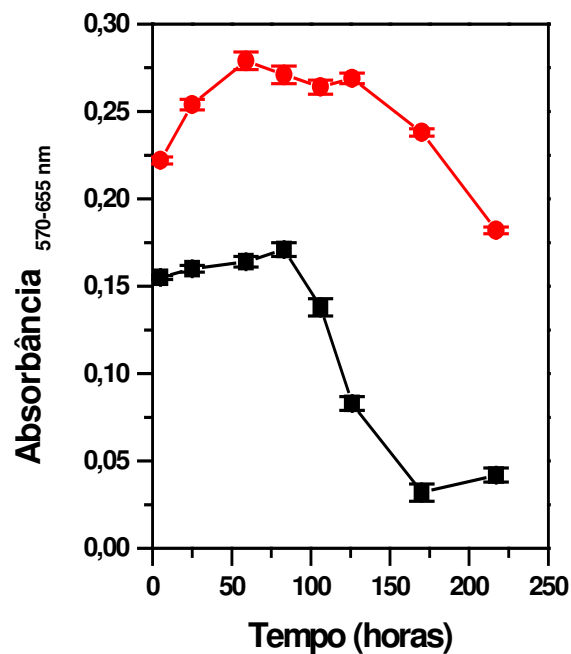
**Figura 10** – Estabilidade da ADH presente no extrato celular bruto em diferentes pHs: (■) pH 4,0; (●) pH 5,0; (▲) pH 6,0; (▼) pH 7,0; (◆) pH 8,5; (○) pH 9,0; (□) pH 10,0.

A **Figura 11** mostra a curva de estabilidade da enzima em função do pH após 80 horas de estocagem a temperatura ambiente (dados retirados da Figura 10). Observa-se que a enzima apresentou uma alta estabilidade a pH 6,0 e 7,0.

**Figura 11** – Estabilidade da ADH a temperatura ambiente por 80 horas.



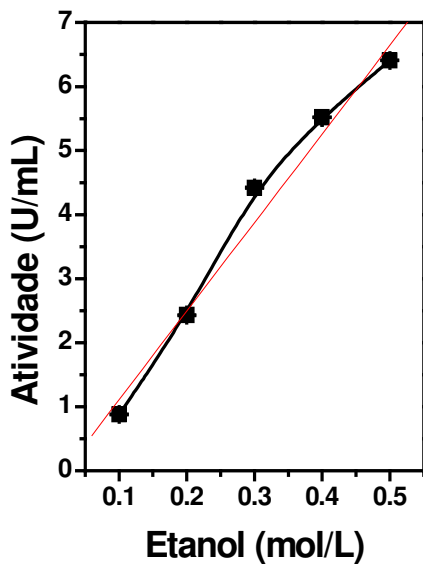
O efeito da temperatura de estocagem (4 e 25°C) na estabilidade da ADH foi determinado utilizando o tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 durante 217 horas como mostra a **Figura 12**. A temperatura mais baixa, 4°C conserva melhor a atividade da enzima.



**Figura 12** – Estabilidade da ADH a temperatura ambiente (■) e a temperatura de geladeira (●).

#### 5.17 CURVA ANALÍTICA DE DOSAGEM DE ETANOL – MÉTODO COLORIMÉTRICO

O método apresentou sensibilidade na faixa de 1000  $\mu\text{M}$  a 5000  $\mu\text{M}$  no tubo de dosagem, após 15 minutos de reação, como se observa na **Figura 13**, o que equivale a soluções padrões de etanol na faixa de  $4,6 \times 10^{-2}$  g/L a  $23,0 \times 10^{-2}$  g/L.



**Figura 13** – Curva analítica do etanol obtida com o extrato celular bruto contendo ADH. Condição do ensaio:  $\text{NAD}^+$  na concentração de 25 mg/mL; MTT 600  $\mu\text{M}$  dissolvido em PBS; PMS 100  $\mu\text{M}$  dissolvido em PBS; etanol (em diferentes concentrações); tampão Tris-HCl 0,1 M a pH 8,5 contendo 1% de triton X-100.  $R^2$  0,99093.

## ***DETERMINAÇÃO DO ETANOL EM DIFERENTES BEBIDAS ALCOÓLICAS ATRAVÉS DAS METODOLOGIAS ULTRAVIOLETA (UV) E COLORIMÉTRICA***

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de comparar as duas metodologias de dosagens montadas: aquela que determina velocidade de consumo de etanol através de leituras no UV (340 nm) e a outra metodologia que determina o consumo do etanol através do desenvolvimento de produto colorido que absorve a 570-655 nm. Ambas metodologias utilizam ADH extraída de levedura de panificação e tempo total de reação de 15 minutos.

Bebidas alcoólicas fermentadas, fermento-distiladas e tipo mistura foram adquiridas no comércio para execução destes ensaios.

### **5.18 DETERMINAÇÃO DE ETANOL PELO MÉTODO UV**

O etanol foi ensaiado, conforme item 4.2.4.1 do presente trabalho, utilizando a seguinte composição de reagentes: solução tampão (contendo pirofosfato de sódio 0,13 M, semicarbazida 0,079 M e glicina 0,024 M) pH 8,8; NAD<sup>+</sup> 0,015 M e 0,51 U de ADH em 0,1 mL da preparação enzimática, em algumas amostras de bebidas alcoólicas utilizando ADH proveniente do extrato celular parcialmente purificado com sulfato de amônio (35-60%), obtido conforme descrito no item 4.2.2. As amostras foram diluídas 2000 vezes e um desvio máximo de apenas 2,1%, quando comparados com as especificações do produtor, foi obtido como observado na **Tabela 14**.

**Tabela 14** – Ensaio do etanol em diferentes amostras de bebidas alcoólicas utilizando a preparação enzimática rica em ADH do extrato parcialmente purificado.

Amostras	Esperado (% vol.)	Encontrado (% vol.)
Cerveja clara Skol	4,70	4,6 ± 0,6 (97,9 %)
Vinho do Porto Adriano	19,5	19,7 ± 0,2 (101,0 %)
Vodka Orlof	38,0	38,2 ± 0,8 (100,5 %)
Steinhaeger Becosa	38,5	38,5 ± 0,7 (100,0 %)
Aguardente Ypióca	39,0	38,2 ± 0,2 (97,9 %)
Whisky J & B	40,0	40,4 ± 0,7 (101,0 %)

A **Tabela 15** mostra os resultados da recuperação dos conteúdos de etanol adicionados sobre amostra de vinho do Porto contendo 249,65 g de etanol por L. Estes resultados demonstram que a metodologia de dosagem do etanol proposta neste trabalho é viável para este tipo de amostra.

**Tabela 15** – Ensaio de recuperação do etanol adicionado em amostra de vinho do Porto utilizando-se metodologia com determinação no UV (340 nm).

Amostra	Etanol			
	Presente (g/L)	Adicionado (g/L)	Encontrado (g/L)	Recuperado (%)
Vinho do Porto	249,65	50	299,20	99,85
		100	344,94	98,65

## 5.19 DETERMINAÇÃO DE ETANOL PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO

O etanol foi ensaiado, conforme item 4.2.4.2 do presente trabalho, utilizando a seguinte composição de reagentes: NAD<sup>+</sup> na concentração de 25 mg/mL; MTT 600  $\mu$ M dissolvido em PBS; PMS 100  $\mu$ M dissolvido em PBS; tampão Tris-HCl 0,1 M a pH 8,5 contendo 1% de triton X-100, em algumas amostras de bebidas alcoólicas utilizando ADH proveniente do extrato celular, obtido conforme descrito no item 4.2.1.B. As amostras foram diluídas 20 vezes e um desvio máximo de apenas 7% foi obtido como observado na **Tabela 16**.

**Tabela 16** – Ensaio do etanol em diferentes amostras de bebidas alcoólicas utilizando a preparação enzimática com ADH do extrato celular bruto.

Amostras	Esperado (% vol.)	Encontrado (% vol.)
Cerveja clara Skol	4,70	4,8 $\pm$ 0,2 (102,1 %)
Vinho do Porto Adriano	19,5	19,2 $\pm$ 0,3 (98,5 %)
Run Bacardi Oro	38,0	36,3 $\pm$ 0,5 (95,5 %)
Vodka Orlof	38,0	35,3 $\pm$ 0,6 (92,8 %)
Steinhaeger Becosa	38,5	38,3 $\pm$ 0,8 (99,5%)
Aguardente Ypióca	39,0	36,3 $\pm$ 0,4 (93,1 %)
Whisky White Horse	40,0	37,6 $\pm$ 0,3 (94,0 %)

A **tabela 17** mostra os resultados da recuperação dos conteúdos de etanol adicionados sobre amostra de vinho do Porto contendo 247,68 g de etanol por L.

Estes resultados demonstram que a metodologia de dosagem do etanol proposta neste trabalho é viável para este tipo de amostra. Os resultados encontrados foram comparados com os valores esperados (de acordo com o fabricante).

**Tabela 17** – Ensaio de recuperação do etanol adicionado em amostra de vinho do Porto utilizando-se metodologia com determinação no visível (570-655 nm).

Amostra	Etanol			
	Presente (g/L)	Adicionado (g/L)	Encontrado (g/L)	Recuperado (%)
Vinho do Porto	247,68	50	291,91	98,06
		100	353,83	101,77

## 6. CONCLUSÕES

A melhor condição de rompimento das células de levedura foi à trituração com pérolas de vidro de 425–600 micras em homogeneizador tipo “Bead Beater”, por 45 minutos, em meio com tampão citrato de sódio 2 mM, pH 6,2, contendo 2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

A purificação da ADH foi mais eficiente utilizando a seguinte seqüência de operações: centrifugação do extrato bruto por 10 minutos a 4000 rpm; precipitação do sobrenadante com sulfato de estreptomicina 1%; centrifugação por 60 min a 7000 rpm, precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio 35% de saturação; centrifugação a 7000 rpm / 60 minutos; precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio 60% de saturação; repouso por 12 horas a 4°C precedido de centrifugação a 7000 rpm / 60 minutos. A resuspensão do precipitado com tampão Tris-HCL 10 mM, pH 7,2, foi dialisada por 24 horas contra solução de ácido cítrico 0,2 mM, pH 5,5, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM e sulfato de manganês 10 mM. A fração resultante foi centrifugada por 15 minutos a 7000 rpm e liofilizada.

O extrato celular bruto ficou 3,69 vezes mais concentrado em ADH após a precipitação com sulfato de amônio (35-60% de saturação) e o fator de purificação de 3,69.

A melhor maneira de estocagem da ADH na forma resuspendida foi ao freezer (-18°C) na presença de PEG 15% (com 50% de atividade preservada) por até 2 meses. Já na forma liofilizada foi na geladeira (4°C) na presença de azida de sódio 1 mM (com 96% de atividade preservada) por até 60 dias.

Na padronização das condições de ensaio de dosagem de etanol pelo método colorimétrico as concentrações dos reagentes foram: 100  $\mu$ L de NAD<sup>+</sup> na concentração de 25 mg/mL; 100  $\mu$ L de MTT 600  $\mu$ M dissolvido em PBS e 1  $\mu$ L de PMS 100  $\mu$ M dissolvido em PBS.

A dosagem de etanol pelo método ultravioleta (faixa de 5  $\mu$ M a 150  $\mu$ M) foi possível utilizando uma fração (precipitado 35-60%) da purificação parcial contendo 30,0 U por mL de ADH. A dosagem de etanol pelo método colorimétrico (faixa de 1000  $\mu$ M a 5000  $\mu$ M) foi possível utilizando extrato celular bruto contendo 5,66 U por mL de ADH.

Amostras de bebidas alcoólicas apresentaram valores de dosagem de álcool etílico correspondentes aos indicados pelos fabricantes.

A recuperação do etanol adicionado na dosagem do vinho do Porto foi de aproximadamente 99,25% no método ultravioleta e 99,91% no método colorimétrico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neurosci. Res.**, v.38, p.325-329, 2000.

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1976. p.46-59.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th.ed. Washington, D. C., 1997. v.2, cap. 26-28.

BARALDI, P. T.; CORREA, A. G. Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a tool for the synthesis of pheromones. **Quim. Nova**, v.27, n. 3, p.421-431, 2004.

BERNT, E.; GUTMANN, I. Ethanol: determination with alcohol dehydrogenase and NAD. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2nd.ed. New York: Academic Press, 1974. v.3, p.1499-1502.

BEUTLER, H-O. Ethanol. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd.ed. New York: Academic Press, 1977. v.6, p.598-606.

BONNICHSEN, R. Determination with Alcohol Dehydrogenase and DPN. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1965. p.285-287.

BRÄNDÉN, C. I.; JÖRNVALL, H.; EKLUND, H.; FURUGREN, B. Alcohol dehydrogenases. In: BOYER, P.D. **The Enzymes**. 3rd.ed. New York: Academic Press, 1975. v.11, p.103-190.

BUCKEE, G. K.; MUNDY, A. P. Determination of ethanol in beer by gas chromatography (Direct Injection): Collaborative trial. **J. Inst. Brew.**, v.99, p.381-384, 1993.

BUTTKE, T. M.; McCUBREY, J. A.; OWEN, T. C. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. **J. Immunol. Methods**, v.157, p.233-240, 1993.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999. 212p.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Electrophoretic identification of clones in Trembling aspen. **Can. J. For. Res.**, v.14, p.740-743, 1984.

CIENFUEGOS, F.; VAITSAMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. p.213-339.

CORY, A. H.; OWEN, T. C.; BARLTROP, J. A.; CORY, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun.**, v.3, p.207-212, 1991.

DAWSON, R. M. C.; ELLIOT, D. C.; JONES, K. M. **Data for biochemical research**. 2nd.ed. Oxford: Oxford University Press, 1969.

DEVAUX-BASSÉGUY, R.; GROS, P.; BERGEL, A. Electroenzymatic processes: a clean technology alternative for highly selective synthesis? **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.68, p.389-396, 1997.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation Techniques. In: DEUTSCHER, M.P. Guide to Protein Purification. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1990. v.182, p.285-300.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 2nd.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.177-193.

FLETCHER, P. J.; STADEN, J. F. Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection. **Anal. Chim. Acta**, v.499, p.123-128, 2003.

FURCO, A. M. Produção de biomassa de levedura em destilaria de álcool. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, Campinas, 1996. **Resumos**. Campinas: ITAL, 1996. p.52-58.

GANZHORN, A. J.; GREEN, D. W.; HERSHEY, A. D.; GOULD, R. M.; PLAPP, B. V. Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.8, p.3754-3761, 1987.

GATTÁS, E. A. L.; PERES, M. F. S. Produção de glycerol-3-fosfato desidrogenase de levedura de panificação. **Braz. J. Food Nutr.**, v.14, p.205-209, 2003.

GATTÁS, E.A.L.; TININIS, C.R.C.S.; LALUCE, C. **Kit econômico de aplicação na rotina industrial para os ensaios de glicerol, malato e etanol**. BR n. PI 0205552, 2002.

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; KYRIAKIDIS, N. V.; ATHANASOPOULOS, P. E. New refractive index method for measurement of alcoholic strength of small volume samples. **J. AOAC Int.**, v.86, n.6, p.1232-1235, 2003.

GOLDEMBERG, J. **Física geral e experimental**. São Paulo: Editora da USP, 1968. v.1, p.37-50.

GOMES, M. T. S. R.; VERÍSSIMO, M. I. S.; OLIVEIRA, J. A. B. P. Alcohol determination using an acoustic wave sensor. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v.369, p.613-615, 2001.

GONCHAR, M. V.; MAIDAN, M. M.; PAVLISHKO, H. M.; SIBIRNY, A. A. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. **Food Technol. Biotechnol.**, v.39, p.07-42, 2001.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. G.; JUAN, P. P.; CASTRO, M. D. L. Determination of ethanol in beverages by flow injection, pervaporation and density measurements. **Talanta**, v.59, p.691-696, 2003.

GUAGLIARDI, A.; MARTINO, M.; IACCARINO, I.; ROSA, M.; ROSSI, M.; BARTOLUCCI, S. Purification and characterization of the alcohol dehydrogenase from a novel strain of *Bacillus stearothermophilus* growing at 70°C. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.28, n.2, p.239-246, 1996.

KITAGAWA, Y.; KITABATAKE, K.; SUDA, M.; MURAMATSU, H.; ATAKA, T.; MORI, A.; TAMIYA, E.; KARUBE, I. Amperometric detection of alcohol in beer using a flow cell and immobilized alcohol dehydrogenase. **Anal. Chem.**, v.63, p.2391-2393, 1991.

LARA, A. B. W. H.; NAZARIO, G.; PREGNOLATTO, W. (Coord.). **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. 2.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. v.1. p.205-227.

LAU, O. W.; LUK, S. F. Spectrophotometric method for the determination of ethanol in beverages and beer samples using cerium (IV) as reagent. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.29, p.469-472, 1994.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods. In: COLOWICK, S. P. e KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**. New York: Elsevier Academic Press, 1957. v.3, p.447-50.

LESKOVAC, V.; TRIVIC, S.; ANDERSON, B. M. Use of competitive dead-end inhibitors to determine the chemical mechanism of action of yeast alcohol dehydrogenase. **Mol. Cell. Biochem.**, v.178, p.219-227, 1998.

LEVERONE, M.R.; OWEN, T.C.; TIEDER, F.S.; STEWART, G.J.; LIM, D.V. Resting-cell dehydrogenase assay measuring a novel water-soluble formazan detects catabolic differences among cells. **J. Microbiol. Methods**, v.25, p.49-55, 1996.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.3, cap.1, p.1-43.

LIU, S. J.; TUBINO, M. A thermistor as a sensor in gas phase flow injection analysis. **Anal. Chim. Acta**, v.366, p.5-10, 1998.

MARCOS, S.; GALBÁN, J.; ALBAJEZ, R.; CASTILLO, J. R. Enzymatic determination of ethanol based on the intrinsic fluorescence of alcohol dehydrogenase. **Anal. Chim. Acta**, v.343, p.117-123, 1997.

MARTOADIPIRAWITO, W.; WHITAKER, J. R. Potassium sorbate inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. **Biochim. Biophys. Acta**, v.77, p.536-544, 1963.

MATAIX, E.; LUQUE DE CASTRO, M. D. L. Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection. **Talanta**. v.51, p.489-496, 2000.

MATTOS, I. L.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M. Simultaneous spectrofluorimetric determination of glycerol and ethanol in wine by flow injection using immobilized enzymes. **Analyst**. v.120, p.179-182, 1995.

MICALES, J. A.; BONDE, M. R.; PETERSON, G. L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. **Mycotaxon**. v.27, p.405-449, 1986.

MOHNS, J. KÜNNECKE, W. Flow analysis with membrane separation and time based sampling for ethanol determination in beer and wine. **Anal. Chim. Acta**, v.305, p.241-247, 1995.

NICULESCU, M.; MIELIAUSKIENE, R.; LAURINAVICIUS, V.; CSÖREGI, E. Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors. **Food Chem.**, v.82, p.481-48, 2003.

OKUMA, Y.; ITO, Y.; ENDO, A. Purification and properties of alcohol dehydrogenase from the acid-and ethanol-tolerant yeast *Candida solicola*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.71, n.5, p.309-312, 1991.

PESSIONE, E. et al. Extraction, purification and characterization of ADH1 from the budding yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Ital. J. Biochem.**, v.39, p.71-82, 1990.

RACKER, E. Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955. v.1, p.500-503.

RANGEL, A. O. S. S.; TÓTH, I. V. Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. **Anal. Chim. Acta**, v.416, p.205-210, 2000.

RASOVSKY, E. M. **Álcool**: destilarias. Rio de Janeiro: IAA, 1973. 384p.

ROSEN, K. In: BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. **Yeast biotechnology**. London: Allen & Unwin, 1987. p.471-500.

SCOPES, R. K. **Protein purification**: principles and practice. 3rd.ed. New York: Springer, 1993. 380p.

SHAW, C. R. Electrophoretic variation in enzymes – mutations which do not alter catalytic activity provide a major tool for biochemistry and genetics. **Science**, v.149, p.936-943, 1965.

SOMERS, W. A. C.; VAN-HARTINGSVELDT, W.; STIGTER, E. A. C.; VAN-DER-LUGT, J. P. Bio-electrochemistry: a powerful tool for the production of ingredients in the food industry. **Agro Food Ind. Hi Tec.**, p. 32-35, 1997.

SREEKUMAR, O.; BASAPPA, S. C. Comparative study on the estimation of ethanol in fermented samples by different methods. **J. Food Sci. Technol.**, v.27, n.5, p.379-380, 1990.

SVENSSON, K.; BÜLOW, L.; KRIZ, D.; KROOK, M. Investigation and evaluation of a method for determination of ethanol with the SIRE<sup>R</sup> Biosensor P100, using alcohol dehydrogenase as recognition element. **Biosens. Bioelectron.**, v.21, p.705-711, 2005.

TELLIER, R.; KRAJDEN, M.; GRIGORIEW, G.A.; CAMPBELL, I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.36, p.1619-1625, 1992.

TININIS, C. R. C. S. **Ensaio enzimático para dosagem do glicerol**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.

VALLESI, M.; HOWELL, G. Which alcohol analysis method should you use? **Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak.**, n.467, p.53-54, 2002.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1992, p.213-339.

WALKER, T.; MORRIS, J.; THRELFALL, R.; MAIN, G. Analysis of wine components in Cynthiana and Syrah wines. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.1543-1547, 2003.

WANG, M. L.; WANG, J. T.; CHOONG, Y. M. Simultaneous quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverage using a rapid gas chromatographic method coupling with dual internal standards. **Food Chem.**, v.86, p.609-615, 2004.

WONG, C. H.; WHITESIDES, G. M. **Enzymes in synthetic organic chemistry**. Tetrahedron Organic Chemistry, Oxford: Pergamon, 1995, v.12.

YARITA, T.; NAKAJIMA, R.; OTSUKA, S.; IHARA, T.; TAKATSU, A.; SHIBUKAWA, M. Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase. **J. Chromatography A**. v.976, p.387-391, 2002.