

Ácido L-Málico, método UV

Número de Catálogo	Apresentação
AK00011	58 testes (manual) / 580 testes (microplaca)

Aplicação

Este kit é indicado para a determinação do ácido L-málico (L-malato) em alimentos, tais como o vinho, a cerveja, o pão, a fruta e o sumo de fruta, bem como em produtos farmacêuticos, produtos cosméticos e amostras biológicas. O seu fundamento baseia-se num método enzimático, rápido, simples e estereo-específico para o analito em causa.

Introdução

O ácido L-málico é um componente importante do ciclo do ácido cítrico, encontrando-se assim presente em animais, plantas e microrganismos. É um dos ácidos mais importantes da fruta, encontrando-se presente em concentrações elevadas no vinho. O ácido málico pode ser usado na tecnologia alimentar uma vez que é mais forte que o ácido cítrico, que é frequentemente usado para o efeito. A decomposição microbiana do ácido L-malato conduz à formação do L-lactato; esta reação é desejável na indústria do vinho, na qual o nível de ácido L-málico é monitorizado, juntamente com o ácido L-lático, durante a fermentação malolática. O ácido L-málico pode ser usado como conservante alimentar (E296) ou intensificador do flavor na indústria alimentar.

Princípio



A quantidade de NADH formado por ação combinada da L-malato desidrogenase (L-MDH) e da aspartato aminotransferase (AST), medida a 340 nm, é estequiométrica com a quantidade de ácido L-málico do volume de amostra.

Especificidade

Este método é específico para a determinação do ácido L-málico. O ácido D-málico, bem como os ácidos D- e L-lácticos, L-aspartico e fumárico não reagem. Os ésteres do ácido L-málico também não reagem.

Sensibilidade e limite de deteção

A sensibilidade do ensaio é de 0,005 AU num volume de amostra de 2,00 mL. Este valor corresponde a uma concentração de ácido L-málico de 0,12 mg/L de amostra para o volume máximo de 2,00 mL. O limite de deteção de 0,25 mg/L resulta de uma diferença de absorvência de 0,010 (340 nm) para um volume de amostra máximo de 2,00 mL.

Linearidade e precisão

A determinação apresenta linearidade entre 0,5 e 30 µg de ácido L-málico por ensaio. Num duplicado da mesma amostra, uma diferença de 0,005 a 0,010 unidades de absorvência pode ocorrer. Para um volume de amostra de 0,10 mL, esta diferença corresponde a uma concentração de ácido L-málico de aprox. 2,49 a 4,98 mg/L de solução de amostra. Se a amostra for pesada durante a sua preparação, e.g. 10 g/L, é de esperar uma diferença de 0,02 a 0,05 g/100 g. O desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação, é de aproximadamente 1 a 2%.

Composição do kit

Solução 1. Tampão de glicilglicina (6 mL, 1 M, pH 10,0) com L-glutamato (1 M) e azida de sódio (0,02% w/v) como conservante. Armazenar entre 2 °C e 8°C.

Solução 2. NAD⁺ (380 mg) e PVP (60 mg). Armazenar entre 2 °C e 8°C (armazenamento prolongado: -30 °C a -15 °C)

Dissolver em 6 mL de água destilada, dividir em aliquotas de volume adequado e armazenar em tubos de PP, de -30 °C a -15 °C, entre utilizações; manter frio durante a utilização.

Suspensão 3. Suspensão de aspartato aminotransferase (AST) / GOT (EC 2.6.1.1) (1,25 mL). Armazenar entre 2 °C e 8°C. Agitar o frasco antes de usar.

Suspensão 4. Suspensão de L-malato desidrogenase (EC 1.1.1.37) (1,25 mL). Armazenar entre 2 °C e 8°C. Agitar o frasco antes de usar.

Solução 5. Solução padrão de ácido L-málico (5 mL, 0,15 mg/mL). Armazenar entre 2 °C e 8°C.

Esta solução padrão pode ser utilizada quando existirem dúvidas sobre a exatidão do método ($\epsilon_{\text{NADH},340 \text{ nm}} = 6300 \text{ L}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$).

Protocolo (análise a ponto final)

Comprimento de onda: 340 nm

Cuvete: 1 cm meio ótico (vidro ou plástico)

Temperatura: ~25 °C

Volume final: 2,34 mL

Amostra: 0,5-30 µg de ácido L-málico por cuvete (num volume de 0,10-2,00 mL)

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

PIPETAR PARA CUVETES (mL)	BRANCO	AMOSTRA
Água destilada	2,10	2,00
Amostra	-	0,10
Solução 1 (tampão gliciglicina)	0,10	0,10
Solução 2 (NAD ⁺)	0,10	0,10
Suspensão 3 (AST)	0,02	0,02
Misturar, medir a absorvência das soluções acima (A1) após aprox. 3 min e iniciar a reação através da adição de		
Suspensão 4 (L-MDH)	0,02	0,02
Misturar, medir a absorvência das soluções acima (A2) no final da reação (aprox. 3 min)		

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

Cálculos

Determinar as diferenças de absorvência para os ensaios do branco e da amostra (A2-A1). Subtrair a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra de modo a obter $\Delta A_{\text{Ácido L-málico}}$. A concentração de ácido L-málico (g/L), baseada no ϵ do NADH a 340 nm ($6300 \text{ L}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$), é calculada do seguinte modo:

$$C (\text{Ácido L-málico}) = 0,4980 \times A_{\text{Ácido L-málico}} \quad [\text{g/L}]$$

No caso da amostra ter sido diluída ou de se ter usado um volume de amostra diferente, o resultado final deve ser multiplicado pelo correspondente fator de diluição/concentração.

Procedimentos alternativos (micro-volumes)

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

Interferências

Se a conversão do ácido L-málico se completar dentro do período especificado para o ensaio (aprox. 3 min), não é de admitir a existência de interferências. Caso se suspeite da presença de substâncias interferentes, deve-se usar um padrão interno na análise. Neste caso, deve obter-se uma recuperação quantitativa do padrão interno. A identificação de perdas no processamento da amostra pode ser identificada através de ensaios de recuperação, baseados na adição de ácido L-málico à amostra nos passos iniciais da extração. O sistema de ensaio contém PVP de modo a evitar a inibição da reação pelos polifenóis (taninos) da amostra.

Informação geral sobre a preparação das amostras

A quantidade total de ácido L-málico na cuvete deve situar-se entre 0,5 e 30 µg. Deste modo, se se usar um volume de amostra de 0,10 mL, a amostra deve ser diluída para concentrações de ácido L-málico entre 5 e 300 mg/L. No entanto, o volume de amostra pode variar entre 0,10 e 2,00 mL, através da substituição da água (analitos variam entre 0,25 e 300 mg/L).

Para realizar este ensaio, use amostras líquidas transparentes e praticamente neutras, diretamente ou após diluição das mesmas; filtrar as soluções turvas; desgaseificar as amostras que contenham dióxido de carbono (e.g. filtração); ajustar o pH das amostras a pH 8-10 através da adição de solução de hidróxido de sódio ou potássio; ajustar amostras ácidas e ligeiramente coradas a pH 8-10 e incubar aproximadamente 30 minutos; medir as amostras "coradas" (se necessário ajustadas a pH 8-10) contra o ensaio em branco; tratar as amostras "fortemente coradas" que forem usadas não diluídas ou com um volume de amostra elevado com PVP; esmagar ou homogeneizar as amostras sólidas ou semi-sólidas, e extrair com água ou dissolvê-las; extrair as amostras com teores elevados de gordura com água quente.

Exemplos de preparação das amostras

Determinação do ácido L-málico nos vinhos tinto e branco

A determinação da concentração de ácido L-málico livre nos vinhos tinto e branco pode ser geralmente realizada sem qualquer tratamento prévio da amostra, com exceção de uma eventual diluição da mesma. Se um vinho tinto necessitar de descoloração, proceder como descrito acima. Uma diluição de 1:10 e um volume de amostra de 0,1 mL são geralmente satisfatórios.

A concentração de ácido L-málico livre e esterificado [L + E] nos vinhos tinto e branco pode ser determinada do seguinte modo: adicionar 6 mL de NaOH 2M a 20 mL de vinho e aquecer com agitação sob refluxo durante 30 min. Depois de arrefecida a amostra, ajustar cuidadosamente o pH a 10 unidades com solução de H₂SO₄ 1 M e completar o volume a 50 mL com água destilada. Após este procedimento, continuar a análise de acordo com o protocolo geral. A concentração obtida é a soma do ácido L-málico livre e esterificado [L + E], sendo a concentração do ácido L-málico esterificado [E] calculada do seguinte modo: $[E] = [L + E] - [L]$.

Determinação do ácido L-málico na cerveja

Geralmente, a amostra não precisa de ser diluída e um volume de amostra de 0,1 mL é satisfatório. A remoção prévia do dióxido de carbono é necessária e pode ser conseguida por agitação.

Determinação do ácido L-málico no sumo de fruta, concentrado e bebidas afins

A concentração de ácido L-málico nestas bebidas pode ser determinada sem qualquer tratamento prévio da amostra, com exceção de eventual diluição. A filtração da amostra é necessária se o líquido se apresentar turvo. As soluções coradas são geralmente apropriadas para análise, se se atender à concentração adequada de ácido L-málico. Geralmente, uma diluição de 1:50 e um volume de amostra de 0,1 mL são satisfatórios.

Determinação do ácido L-málico em alimentos sólidos

Homogeneizar aproximadamente 10 g de amostra sólida com um homogeneizador adequado.

Extrair aproximadamente 2 g de material representativo em 40 ml de água destilada durante 30 min, com aquecimento a 60 °C, se necessário. Transferir o extrato para um balão volumétrico de 50 ml e ajustar o volume até ao traço com água destilada. Se necessário, filtrar e diluir as soluções turvas.

Referências

Mollering, H. (1985). L-Malate. In: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VII, pp. 39-47, VCH Publishers (UK), Cambridge, UK.

AOAC Official Methods of Analysis (2002). Method 993.05 "L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice". 17th ed., Chapter 37, p. 15.

Recomendações

Este método é recomendado/aprovado por:

- Regulamento da Comissão Europeia (análise de vinho);
- Padrões Europeus, Holandês, Francês, Alemão e Russo (EN, NEN, NF, DIN, GOST);
- Legislação alimentar Alemã, Suíça e Italiana;
- International Wine Office (OIV), International Federation of Fruit Juice Producers (IFU), Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.), and Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK) (Central European Commission for Brewing Technology);
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (análise de sumo de maçã).

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

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