

Ácido L-Láctico, método UV

Número de Catálogo	Apresentação
AK00131	50 testes

Aplicação

Este kit é indicado para a determinação estereo-específica do ácido L-láctico (L-lactato) em alimentos, tais como o leite e os produtos lácteos (e.g. queijo e iogurte), o vinho, a cerveja, o pão e produtos de pasteleria, alimentos dietéticos, fruta e vegetais (e.g. sumo, geleia e polpa de tomate), produtos cárneos, refrigerantes e limonadas, vinagre, bem como na alimentação animal, cosmética, papel e produtos farmacêuticos e biológicos. Ver também o nosso kit para a determinação do ácido D-/L-láctico (cat. n. AK00141).

Introdução

O ácido L-láctico é o produto final do metabolismo de uma grande variedade de seres vivos, incluindo as bactérias lácticas. O L-lactato no vinho é também formado durante a fermentação malo-láctica ("fermentação secundária"). O teor de lactato na cerveja indica a presença de *Lactobacilli* na sua produção. A determinação específica dos estereo-isómeros do lactato é de elevado interesse, por exemplo, na manufatura de produtos de leite fermentado de modo a avaliar a atividade de microrganismos. O teor de L-lactato no ovo, líquido ou em pó, é um bom indicador do estado higido dos produtos. O ácido láctico comercial pode não conter as formas estereo-isoméricas na razão de 1:1. O ácido láctico livre na presença de água ou humidade tende a formar o dímero lactil-lactato, o qual não é determinado por esta reação enzimática; deste modo, este composto químico não pode ser usado para a preparação de soluções padrão.

Princípio



A determinação do ácido L-láctico requer duas reações acopladas. A quantidade de NADH resultante da ação combinada da L-lactato desidrogenase (L-LDH; EC 1.1.2.3) e D-alanina aminotransferase / transaminase D-glutâmica-pirúvica (ALT/GPT; EC 2.6.1.2) é medida a 340 nm. Dado que a primeira reação se encontra em equilíbrio é necessário acoplar uma segunda reação de modo a completar a primeira (análise a ponto final).

Especificidade

Este método é específico para a determinação do ácido L-láctico.

Sensibilidade e limite de deteção

A sensibilidade do ensaio é de 0,005 AU num volume de amostra de 1,50 mL. Este valor corresponde a uma concentração de ácido L-láctico de 0,107 mg/L de amostra quando medida a 340 nm. O limite de deteção de 0,214 mg/L resulta de uma diferença de absorvência de 0,010 (340 nm) para um volume de amostra máximo de 1,50 mL.

Linearidade e precisão

A determinação apresenta linearidade entre 0,3 e 30 µg ácido L-láctico por ensaio (v = 1,50 mL). Num duplicado da mesma amostra, uma diferença de 0,005 a 0,010 unidades de absorvência pode ocorrer (0,107-0,214 mg/L de ácido L-láctico, v = 1,50 mL). O desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação, é de aproximadamente 1 a 3% no intervalo de análise.

Composição do kit

Solução 1. Tampão glicilglicina (25 mL, 0,5 M, pH 10,0), D-glutamato (0,5 M) e azida de sódio (0,02% w/v) como conservante. Armazenar de 2 °C a 8 °C.

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

Dissolver em 5,5 mL de água destilada, dividir em alíquotas de volume adequado e armazenar em tubos de PP a -20 °C entre utilizações (estável durante 2 anos); manter frio durante a utilização. Uma vez dissolvido, o reagente é estável a -30 °C a -15 °C, até à data de validade.

Suspensão 3. D-Alanina aminotransferase (D-ALT) em 3,2 M de sulfato de amónio (1,1 mL). Armazenar de 2 °C a 8 °C. Agitar antes de usar

Suspensão 4L. L-Lactato desidrogenase (L-LDH) em 3,2 M de sulfato de amónio (1,1 mL). Armazenar de 2 °C a 8 °C. Agitar antes de usar.

Solução 5L. Solução padrão de ácido L-láctico (5 mL, 0,15 mg/mL). Armazenar de 2 °C a 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: 2.24 mL

Amostra: 0,3-30 µg de ácido L-láctico por cuvete (num volume de amostra de 0,10-1,5 mL)

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

PIPETAR PARA CUVETES (mL)	BRANCO	AMOSTRA
Água destilada (~25 °C)	1,60 mL	1,50 mL
Amostra	-	0,10 mL
Solução 1 (tampão glicilglicina)	0,50 mL	0,50 mL
Solução 2 (NAD ⁺)	0,10 mL	0,10 mL
Suspensão 3 (D-ALT)	0,02 mL	0,02 mL
Misturar, medir a absorvência das soluções acima (A1) após ~3 min e iniciar a reação através da adição de		
Suspensão 4L (L-LDH)	0,02 mL	0,02 mL
Misturar e medir a absorvência das soluções (A2) no final da reação (aprox. 10 min).*		

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

*Se a reação não tiver terminado após 10 min, continuar a medir a absorvência até que esta permaneça constante ou aumente uniformemente em cada

Cálculos

Determinar a diferença de absorvências para o branco e para a amostra (A2-A1). A concentração de ácido L-láctico (g/L), baseada na ϵ do NADH a 340 nm ($6300 \text{ L}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$), é calculada da seguinte forma:

$$C (\text{Ácido L-láctico}) = 0.3204 \times \Delta A_{\text{Ácido L-láctico}} \quad [\text{g/L}]$$

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

Procedimentos alternativos (micro-volumes)

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

Interferências

Se a conversão do ácido L-láctico tiver terminado dentro do tempo especificado no ensaio (aprox. 10 min), não ocorreram interferências. No entanto, esta circunstância pode ser avaliada pela adição de ácido L-láctico (aprox. 15 µg em 0,1 mL) à cuvete após a reação ter terminado. Neste caso, um aumento significativo da absorvência deve ser observado.

Pequenas quantidades de GIDH na AST/GOT podem causar reações “creep” dependentes dos reagentes, as quais podem ser eliminadas por extrapolação ou, preferencialmente, através da medição da absorvência do branco e da amostra imediatamente após o outro.

Uma vez que a transpiração das mãos contém ácido L-láctico deve-se ter o cuidado de não tocar com estas nas pontas das pipetas.

Informação geral sobre a preparação das amostras

A quantidade de ácido L-láctico presente na cuvete deve situar-se entre 0,3 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-láctico entre 3 e 300 mg/L. No entanto, o volume de amostra pode variar entre 0,10 e 1,50 mL, através da substituição da água (analitos variam entre 0,20 e 300 mg/L).

A polivinilpirrolidona (PVP) foi incorporada no ensaio de modo a evitar a interferência dos taninos presentes principalmente no vinho tinto.

Para realizar este ensaio, use amostras líquidas transparentes e descoradas, com um pH ajustado a 10,0, diretamente ou após diluição. Filtrar as soluções turvas; degaseificar as amostras que contenham dióxido de carbono (e.g. filtração); ajustar o pH das amostras ácidas, as quais são usadas diretamente no ensaio, a pH 10,0 através da adição de solução de hidróxido de sódio ou potássio e incubar à temperatura ambiente durante aprox. 30 min; medir as amostras coradas (ajustar a pH 10,0, se necessário) contra um branco de amostra (isto é, amostra sem L-LDH); tratar as amostras fortemente coradas que sejam usadas diretamente ou com um volume de amostra elevado com PVPP (adicionar 0,2 g de PVPP/10 mL de amostra, agitar durante 5 min e filtrar com papel de filtro Whatman nº 1); esmagar ou homogeneizar as amostras sólidas ou semi-sólidas, extrair com água ou dissolver; extrair as amostras com gordura com água quente.

Exemplos de preparação das amostras

Determinação do ácido L-láctico livre e esterificado nos vinhos tinto e branco

A concentração de ácido L-láctico livre nos vinhos tinto e branco pode geralmente ser determinada sem qualquer tratamento prévio da amostra. Uma diluição da amostra de 1:10 e um volume de amostra de 0,1 mL são geralmente adequados.

Para quantificar a concentração do ácido L-láctico livre e esterificado [L + E] nos vinhos branco e tinto, proceder do seguinte modo: adicionar 2 mL de NaOH 2 M a 20 mL de vinho e aquecer sob refluxo durante 15 min com agitação. Após arrefecimento, ajustar o pH da solução a 10,0 com H₂SO₄ 1 M e acertar o volume a 100 mL com água destilada. Em seguida, analisar a amostra de acordo com o procedimento geral, com diluição prévia, se necessário. Usualmente, não é necessária diluição adicional da amostra e um volume de amostra de 0,1 mL é satisfatório. A concentração obtida é a soma do ácido L-láctico livre e esterificado [L + E] e, assim sendo, a concentração do ácido L-láctico esterificado [E] pode ser determinada do seguinte modo: $[E] \text{ (g/L)} = [L + E] - [L]$.

Determinação do ácido L-láctico na cerveja

A concentração de ácido L-láctico na cerveja pode, geralmente, ser determinada sem qualquer tratamento prévio da amostra, com exceção da remoção do dióxido de carbono por agitação durante aprox. 1 min com uma vareta de vidro. Geralmente, não é necessária diluição da amostra e um volume de amostra de 0,2 mL é adequado.

Determinação do ácido L-láctico no vinagre e em líquidos com vinagre

A concentração de ácido L-láctico do vinagre ou de líquidos afins pode geralmente ser determinada sem qualquer tratamento prévio da amostra, com exceção da filtração e diluição, caso seja necessário. Geralmente, não é necessário a diluição da amostra e um volume de amostra de 0,1 mL é satisfatório.

Determinação do ácido L-láctico no iogurte e no leite

Pesar aprox. 1 g de iogurte homogeneizado ou aprox. 10 g de leite, em balança de precisão, e adicionar a um balão volumétrico de 100 mL contendo 60 mL de água destilada. Adicionar as seguintes soluções e agitar após cada adição: 2 mL de solução de Carrez I (3,60 g de hexaferrocianato de potássio (II) {K₄[Fe(CN)₆].3H₂O} em 100 mL de água destilada), 2 mL de solução de Carrez II (7,20 g de sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O) em 100 mL de água destilada) e 4 mL de solução de NaOH (100 mM). Ajustar o volume a 100 mL com água destilada, agitar e filtrar. Geralmente, não é necessária qualquer diluição adicional e volumes de amostra de 0,1 mL (para o iogurte) ou de 1,0 mL (para o leite) são adequados.

Determinação do ácido L-láctico no queijo

Pesar aprox. 1 g de queijo, em balança de precisão, para um balão volumétrico de 100 mL contendo aprox. 70 mL de água destilada e aquecer a 60 °C com agitação ocasional durante 20 min, ou até à sua dispersão total. Ajustar o volume a 100 mL com água destilada, guardar entre 0 °C e 4 °C durante aprox. 20 min para permitir a separação da gordura e, em seguida, filtrar. Usualmente, não é necessária a diluição prévia da amostra e um volume de amostra de 0,1 mL é adequado.

Determinação do ácido L-láctico em produtos cárneos

Pesar aprox. 5 g de amostra homogeneizada, em balança de precisão, adicionar a um copo graduado com 20 mL de ácido perclórico 1 M e homogeneizar com um dispersor durante 5 min. Adicionar aprox. 40 mL de água destilada e ajustar o pH a aprox. 10 com KOH 2 M. Transferir o conteúdo para um balão volumétrico de 100 ml e completar até ao traço com água destilada (se se formar uma camada de gordura, assegurar que a camada aquosa atinge o traço do balão e que esta se situa acima do mesmo). Guardar entre 0 e 4 °C durante aprox. 20 min para permitir a separação da gordura e a precipitação do perclorato de potássio. Filtrar, descartando os primeiros mL do filtrado. Para o ensaio, usar a solução diluída límpida ou, se necessário, ligeiramente turva. Usualmente, uma diluição da amostra de 1:2 e um volume de amostra de 0,1 mL são adequados.

Referências

Noll, F. (1988). L-(+)-Lactate. In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VI, pp. 582-588, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

Recomendações

A determinação estereó-específica dos ácidos L- e D-láctico é recomendada/aprovada por:

- Padrões Internacionais e Russo (EN, DIN, ISO, GOST);
- Regulamento da Comissão Europeia (análise de vinho);
- Recomendado pela International Wine Office (OIV), International Dairy Federation (IDF), 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.)

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.