

L-Arginina/Ureia/Amónia, método UV

Número de catálogo: AK00171, 50 testes de cada

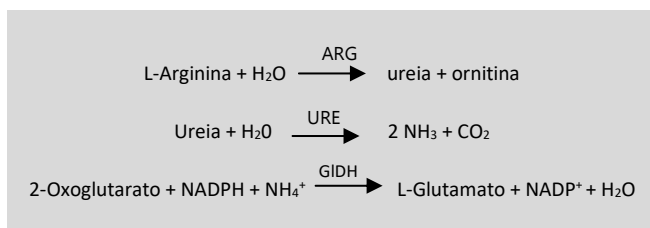
Aplicação

Este kit é indicado para a determinação simultânea de L-arginina, ureia e amónia (azoto assimilável pelas leveduras, AAL) em alimentos e na indústria vitivinícola (sumo de uva, mosto e vinho em fermentação), bem como em produtos farmacêuticos e amostras biológicas. O kit é adequado para os formatos manual e de micro-volume. O seu fundamento baseia-se num método enzimático, rápido, simples e específico para os analitos em causa.

Introdução

A determinação do AAL (L-arginina, ureia e amónia) é um indicador da quantidade de azoto disponível para o crescimento das leveduras. O AAL compreende três componentes: iões amónio livres, azoto do grupo amina dos aminoácidos livres e azoto da cadeia lateral da L-arginina. Uma vez que a concentração destes compostos varia muito, tem que se determinar cada um deles individualmente para o cálculo exato do AAL, o que é possível com este kit Nzytech. Na indústria vitivinícola, o AAL pode ser controlado pela adição de suplementos nutritivos ao sumo de uva antes ou durante o processo fermentativo. A Nzytech comercializa também kits analíticos para a determinação da amónia (AK000091) e da ureia e amónia (AK000101).

Princípio



A quantidade de NADP⁺ resultante da ação combinada da arginase (ARG), urease (URE) e glutamato desidrogenase (GIDH), determinada a 340 nm, é estequiométrica com a quantidade de L-arginina, ureia e amónia no volume de amostra.

Especificidade

Este método é específico para a determinação da L-arginina, ureia e amónia.

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 L-arginina, ureia e amónia de 0,093, 0,031 e 0,018 mg/L de volume de amostra, respetivamente, quando medida a 340 nm. O limite de deteção de 0,37, 0,13 e 0,07 mg/L de L-arginina, ureia e amónia,

respetivamente, resulta de uma diferença de absorvência de 0,020 (340 nm) para um volume de amostra máximo de 2,00 mL.

Linearidade e precisão

A determinação apresenta linearidade entre 1,0 e 35 µg de L-arginina/ensaio, 0,3 e 14 µg ureia/ensaio e 0,2 e 7 µg amónia/ensaio. Num duplicado da mesma amostra, uma diferença de 0,005 a 0,010 unidades de absorvência pode ocorrer. O desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação, é de aproximadamente 1 a 3%.

Composição do kit

Solução 1. Tampão TEA (25 mL, 0,5 M, pH 8,0). Armazenar de 2 °C a 8 °C.

Comprimidos 2. 125 comprimidos de NADPH fornecidos num frasco plástico com excicante. Deixar o frasco atingir a temperatura ambiente (na presença de excicante, se possível) antes de o abrir para retirar os comprimidos. Armazenar seco, de 2 °C a 8 °C. (Armazenamento prolongado de -30 °C a -15 °C)

Adicionar 5 comprimidos por mL de solução 1 (Solução 1+2) num tubo de ensaio e agitar intermitentemente durante 2-3 min. Usar 0,5 mL de Solução 1+2 por ensaio, incluindo o ensaio em branco.

Suspensão 3. Glutamato desidrogenase (GIDH) em 2,5 M de sulfato de lítio (EC 1.4.1.2; 1,1 mL, 921 U/mL). Armazenar de 2 °C a 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Suspensão 4. Urease em 2,5 M de sulfato de lítio (EC 3.5.1.5; 1,1 mL, 3000 U/mL). Armazenar de 2 °C a 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Suspensão 5. L-Arginase em 2,5 M de sulfato de lítio (EC 3.5.3.1; 1,1 mL, 8300 U/mL). Armazenar de 2 °C a 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Solução 6. Solução padrão de amónia (5 mL, 0,04 mg/mL) em 0,02 % (w/v) de azida de sódio. Armazenar de 2 °C a 8 °C.

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

Padrão em pó 7. Padrão de L-arginina em pó (~2 g). Armazenar seco, de 2 °C a 8 °C.

Pesar, numa balança de precisão, aprox. 100 mg de L-arginina para um balão volumétrico de 1 L, encher até ao traço com água destilada e agitar vigorosamente. Esta solução controlo é estável durante ~3 meses a -30 °C a -15 °C.

Segurança

Os reagentes usados nesta determinação simultânea de L-arginina, ureia e amónia não são perigosos (ver “Hazardous Substances Regulations”). No entanto, devem ser seguidas as medidas gerais de segurança que se aplicam ao uso de produtos químicos.

Procedimento (análise a ponto final)

Comprimento de onda: 340 nm

Cuvete: 1 cm de meio ótico (vidro ou plástico)

Temperatura: ~25 °C

Volume final: 2,62 mL (amónia); 2,64 mL (ureia); 2,66 mL (L-arginina)

Amostra: 0,2–7 µg de amónia, 0,3–14 µg de ureia e 1–35 µg de L-arginina por cuvete (num volume de 0,1–2,00 mL)

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

Pipetar para cuvetes (mL)	Branco	Amostra
Água destilada (~25 °C)	2,10	2,00
Amostra (entre 0,10 e 2,00 mL)	-	0,10
Solução 1+2 (NADPH/padrão TEA)	0,50	0,50
Misturar, medir a absorvência das soluções acima (A1) após aprox. 2 min e iniciar a reação através da adição de		
Suspensão 3 (GIDH)	0,02	0,02
Misturar e medir a absorvência das soluções (A2) no final da reação (~4 min)*. Em seguida, adicionar		
Suspensão 4 (Urease)	0,02	0,02
Misturar e medir a absorvência das soluções (A3) no final da reação (~7 min)*; **		
Suspensão 5 (L-Arginase)	0,02	0,02
Misturar e medir a absorvência das soluções (A4) no final da reação (~15 min)*; **		

Misturar com espátula plástica ou por inversão suave após tapar a cuvete com a sua ou Parafilm®.

* Se necessário, continuar a ler as absorvências em intervalos de 5 min até que a reação termine.

** Se o valor final de absorvência for inferior a 0,5 AU, diluir a amostra em conformidade e repetir o ensaio.

Cálculos

Determinar as diferenças de absorvência para os ensaios do branco e da amostra (A1-A2). Subtrair a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra de modo a obter $\Delta A_{\text{Amónia}}$. Determinar a diferença de absorvências para os ensaios do branco e da amostra (A2-A3). Subtrair a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra de modo a obter ΔA_{Urea} . Finalmente, determinar a diferença de absorvências para os ensaios do branco e da amostra (A3-A4). Subtrair a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra de modo a obter $\Delta A_{\text{L-arginina}}$.

As concentrações de amónia (g/L), ureia (g/L) e L-arginina, baseadas na Abs do NADH a 340 nm ($6300 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), são calculadas do seguinte modo:

$$C(\text{amónia}) = 0.07082 \times \Delta A_{\text{Amónia}} \quad [\text{g/L}]$$

$$C(\text{ureia}) = 0.2517 \times \Delta A_{\text{Urea}} \quad [\text{g/L}]$$

$$C(\text{L-arginina}) = 0.3678 \times \Delta A_{\text{L-arginina}} \quad [\text{g/L}]$$

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.

O AAL (mg azoto/L) pode ser calculado a partir das concentrações de amónia, ureia e L-arginina, com base na seguinte equação:

$$\text{AAL} = 1000 \times \left[\frac{\text{g amónia/L} \times 14,01}{17,03} + \frac{\text{g ureia/L} \times 28,02}{60,06} + \frac{\text{g L-arginina/L} \times 42,03}{174,21} \right]$$

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 autoanalísadores. Basicamente, os volumes de ensaio do presente protocolo (formato cuvete) devem ser reduzidos cerca de 10 vezes para adaptação ao formato microplaca ou autoanalísador. No entanto, na utilização destes formatos de micro-volume deve ter-se em atenção que a espessura do meio ótico é geralmente inferior à espessura do meio ótico de referência (1 cm). Deste modo, para calcular o teor de analito nas amostras deve seguir uma das três estratégias possíveis descritas em “Alternative Procedures Brochure”, disponível em www.nzytech.com.

Interferências

Se a conversão de L-arginina, ureia e amónia se completar dentro do período especificado para o ensaio, não é de admitir a existência de interferências. Caso se suspeite da presença de substâncias interferentes, deve adicionar-se L-arginina (~10 µg em 0,1 mL) à cuvete após a reação terminar. Neste caso, deve observar-se um decréscimo significativo do valor da absorvência no ensaio. De um modo geral, a identificação de substâncias interferentes na amostra pode determinar-se pelo uso de um padrão interno e da sua recuperação quantitativa. Muito embora os taninos presentes no sumo de fruta possam originar a inibição de algumas GIDH, a enzima usada neste kit não apresenta essa limitação.

Informação geral sobre a preparação de amostras

A quantidade de L-arginina, ureia e amónia presentes na cuvete devem situar-se entre 1 e 35 µg, 0,3 e 14 µg, e 0,2 e 7 µg, respetivamente. Deste modo, para um volume de amostra de 0,10 mL, a amostra deve ser diluída para concentrações de L-arginina, ureia e amónia entre 50 e 400 mg/L, 20 e 140 mg/L, e 10 e 80 mg/L, respetivamente. No entanto, o volume de amostra pode variar entre 0,10 e 2,00 mL, através da substituição por água.

Para realizar este ensaio, usar amostras líquidas transparentes e praticamente neutras, diretamente ou após diluição das mesmas; filtrar as soluções turvas; degaseificar as amostras que contenham dióxido de carbono (e.g. filtração); ajustar o pH das amostras ácidas a pH 8 através da adição de solução de hidróxido de sódio ou potássio; ajustar amostras ácidas e ligeiramente coradas a pH 8 e incubar aproximadamente 15 minutos; medir as amostras “coradas” (se necessário ajustadas a pH 8) contra o ensaio em branco; tratar as amostras “fortemente coradas” que forem usadas não diluídas ou com um volume de amostra elevado com 0.2 g PVPP/10 mL de amostra; 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 a 60 °C.

Exemplos de preparação de amostras

Determinação da L-arginina e amónia no sumo de uva

A determinação da concentração de L-arginina e amónia nos sumos de uva branca e vermelha pode ser geralmente realizada sem qualquer tratamento prévio da amostra, com exceção de uma eventual filtração e diluição da mesma. No entanto, não é geralmente necessário diluir a amostra e um volume de amostra entre 25 e 100 µL é geralmente satisfatório.

Determinação da L-arginina, ureia e amónia no mosto e no vinho

A concentração de L-arginina, ureia e amónia nos mostos e vinhos branco e tinto pode ser determinada geralmente sem qualquer tratamento da amostra, com excepção da eventual filtração e diluição. No entanto, não é geralmente necessária a diluição da amostra e um volume de 25 a 100 µL de amostra é geralmente satisfatório.

Referências

Orduna, M. (2001). Quantitative determination of L-arginine by enzymatic end-point analysis. J Agric Food Chem, 49, 549-552.

Recomendações

Este método apresenta menos interferências do que os métodos químicos sendo por isso recomendado/aprovado por:

- Legislação alimentar Alemã e Holandesa (determinações de ureia e amónia);

- Recomendado por Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK) (Central European Commission for Brewing Technology) (determinações de ureia e amónia).

V2201

Certificado de Análise

Teste	Critério	Resultado
Teste de desempenho	Reação completa dentro do período definido	Cumprir a especificação
	Valor da solução padrão +/- 10%	Cumprir a especificação
Absorvência do branco	Valor do ensaio em branco +/- 10%	Cumprir a especificação

Aprovado por:

Patrícia Ponte
Gestora da Qualidade, Sistemas de Qualidade

Destinado apenas a investigação

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

