



Um método simples e eficaz para a dosagem enzimática do ácido fumárico nos vinhos

Daniel Fernández-Vázquez^{1,3}, Nicolas Rozès², Joan M. Canals¹, Albert Bordons³, Cristina Reguán³ and Fernando Zamora¹

¹ Grup de Tecnologia Enològica, Rovira i Virgili University, Faculty of Oenology, Biochemistry and Biotechnology Department, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

² Grup de Biotecnologia Microbiana dels Aliments, Rovira i Virgili University, Faculty of Oenology, Biochemistry and Biotechnology Department, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

³ Grup de Biotecnologia Enològica, Rovira i Virgili University, Faculty of Oenology, Biochemistry and Biotechnology Department, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Produtos químicos e equipamento necessário

- Um espectrofotómetro capaz de trabalhar em ultravioleta (365nm).
- Bacias descartáveis de polimetacrilato de metilo (PMMA) semi-micro, gama de comprimentos de onda aplicável de 300 a 900 nm, trajecto óptico de 10 mm.
- Uma centrifugadora na bancada e tubos de centrifugadora adequados.
- Material volumétrico habitual e pipetas automáticas de 10-50, 50-200 e 200-1000 µL.
- Um kit enzimático para dosagem comercial do ácido L-málico (r-Biopharm®, Art. No: 10139068035, Darmstadt, Germany).
- Fumarase de coração de porco (Ref.: F1757, 2500 unidades, Sigma-Aldrich).
- Sódio L-glutamato. 1H₂O (99%) (CAS 6106-04-3).

Mecanismo de ação da reação enzimática

O método enzimático proposto baseia-se no kit clássico de quantificação do ácido L-málico, com a inserção de uma nova etapa, catalisado pela enzima fumarase (EC 4.2.1.2). Esta enzima transforma de forma reversível o ácido fumárico (AF) em ácido L-málico, permitindo assim a dosagem do ácido fumárico, associando-o com um kit clássico de dosagem do ácido L-málico.

A figura 1 mostra o seu mecanismo de ação.

De forma resumida, quando a L-malato desidrogenase é adicionada ao meio reacional que contém a amostra do vinho, o tampão, a coenzima dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺), um excesso de L-glutamato (L-Glu) e a enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), o ácido L-málico (AM) é completamente transformado em oxaloacetato (OAA) e em NAD⁺ na forma reduzida correspondente (NADH). Isto significa que a produção de NADH será estequiométrica com a concentração inicial em AM, o que permitirá quantificá-la ao medir o aumento da absorção de 365nm. Se a fumarase (FUM) for adicionada uma vez terminada esta reação, o AF é transformado em AM, que é em seguida transformado, primeiro em OAA e depois em ácido L-aspartato, em analogia com a reação enzimática acima descrita. Assim, provoca-se um segundo aumento da concentração em NADH, que é estequiométrico com a concentração inicial em AF, permitindo quantificá-la e determinar um segundo aumento de absorção de 365nm.

Protocolo de quantificação do ácido fumárico utilizando o método enzimático proposto

Todas as amostras foram centrifugadas e diluídas a 1:10 com água ultrapura com qualidade Milli-Q (ultrapura do tipo 1), para

A utilização do ácido fumárico (E297) numa dose máxima de 0,6 g/L para inibir a fermentação malolática dos vinhos, foi recentemente aprovada pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV)¹ e pela União Europeia (UE)². Este artigo descreve um método enzimático recentemente publicado para dosear simultaneamente os ácidos L-málico e fumárico³. Este método, muito simples e eficaz, utiliza a metodologia de dosagem do ácido L-málico a partir de um kit enzimático comercial, acrescentando uma etapa suplementar, na qual a enzima fumarase é adicionada para transformar o ácido fumárico em ácido L-málico.

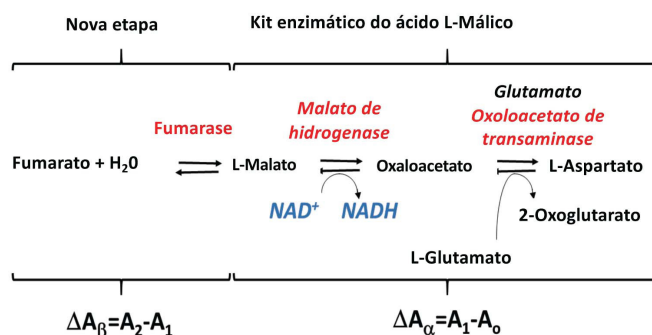


FIGURA 1. Mecanismo de ação da dosagem enzimática do ácido fumárico.

QUADRO 1. Procedimento para a quantificação dos ácidos fumárico e L-málico.

	Pipetar na bacia	Volume (µL)	
		Dosagem convenção al	Dosagem para vinhos com mais de 4g/L de MA
Solução 1	Ácido L-Glutâmico (100mM) em tampão de glicilglicina, pH 10	400	400
Solução 1*	Ácido L-Glutâmico ácido (300mM) em Na ₂ CO ₃ (2% p/v)	0	200
Solução 2	Solução NAD ⁺ (55mM)	80	150
Solução 3	GOT (400U/mL)	4	4
Amostra/ Padrão	Vinho, Branco (água destilada) ou standard (sol. 5)	40	40
Água	Qualidade Ultrapura Milli-Q	360	90
Misturar, incubar 5 minutos a 25°C, ler a absorção a 365nm (A0), e em seguida adicionar			
Solução 4	L-MDH (6,000 U/mL)	4	4
Misturar, incubar 5 minutos a 25°C, ler a absorção a 365nm (A1), e em seguida adicionar			
Fumarase	FUM (1,125U/mL)	5	5
Misturar, ler a absorção a 365nm após 50 minutos (A2)			

ajustar a concentração dos dois ácidos (AM e AF) à sensibilidade do kit comercial L-málico. Todas as avaliações de absorção foram efetuadas a 365nm, uma vez que, a este comprimento de onda, o coeficiente de extinção molar do NADH é adaptado para trabalhar com uma diluição de 1:10 unicamente. Trabalhar a 334 ou 340nm exigiria diluições desnecessariamente maiores. O quadro 2 mostra o protocolo final adequado, no qual existem duas opções em função da concentração de ácido L-málico da amostra. O procedimento analítico foi adaptado do kit enzimático comercial do ácido L-málico descrito pelo fabricante.

As soluções 1 a 4 são as que correspondem ao kit comercial. A solução da fumarase contém 1120 unidades enzimáticas/ml. A solução 1* é uma solução de ácido L-glutâmico (300mM) que só deve ser utilizada quando a concentração de ácido L-málico da amostra for superior a 4g/L.

As concentrações finais de AM e AF podem ser calculadas utilizando as equações seguintes, que foram obtidas tendo em conta o volume da amostra utilizada para a avaliação, o volume final na bacia, do fator de diluição utilizado na amostra e do coeficiente de extinção molar do NADH a 365nm.

$\Delta A_{\alpha} = (A_1 - A_0)$ $[\text{Ácido L-Málico}] \text{ (g/L)} = 8.756 \times \Delta A_{\alpha}$	$\Delta A_{\beta} = (A_2 - A_1)$ $[\text{Ácido fumárico}] \text{ (g/L)} = 7.622 \times \Delta A_{\beta}$
--	--

Linearidade do método proposto em diferentes meios

A figura 2 apresenta os resultados obtidos para as concentrações em AM e AF em diferentes meios: solução sintética de um vinho modelo sem suplementos em ácido L-málico (figura 2A), solução sintética de um vinho modelo com suplemento em ácido L-málico (figura 2B), vinho branco (Figura 2C), vinho tinto sem suplemento em ácido L-málico (Figura 2D), vinho tinto com suplemento em ácido L-málico (Figura 2E) e sumo de uva branca (Figura 2F).

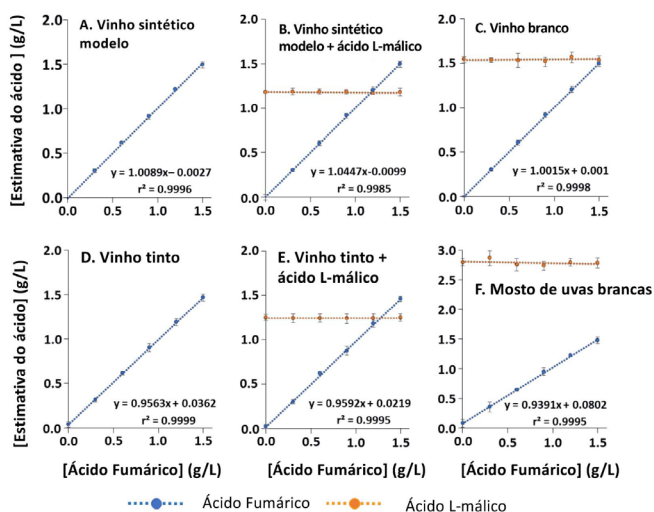


FIGURA 2. Dosagens dos ácidos fumárico e L-málico em diferentes soluções.

Estes gráficos mostram que, em todos os meios estudados, a concentração em AF apresentava coeficientes de regressão linear satisfatórios (r^2 compreendidos entre 0,9985 e 0,9999). Além disso, as inclinações das linhas de regressão estavam muito próximas de 1 (entre 0,9391 e 1,0447), o que indica que a recuperação do AF por adição, estava quase completa com este método. Estes resultados confirmam, portanto, que o AF pode ser analisado com êxito utilizando o novo método enzimático proposto.

Conclusões

O método enzimático proposto para a análise do ácido fumárico revelou-se eficaz e suficientemente robusto em diferentes meios (solução sintética, vinho branco, vinho tinto e mesmo no sumo de uva branco). Com a inclusão de uma nova etapa (a adição da enzima fumarase) no protocolo de dosagem do ácido L-málico do kit comercial, é possível determinar eficazmente as concentrações de ácido fumárico numa gama de 0 a 1,5 g/L, o que cobre amplamente a dose máxima autorizada pela OIV desse ácido (0,6 g/l). O método também permite dosar o ácido L-málico, uma vez que as primeiras etapas são precisamente as utilizadas na análise deste ácido com o auxílio do kit comercial. No entanto, se a concentração em L-málico da amostra for muito elevada (≥ 4 g/l), é necessário fazer uma alteração neste método, que exige o aumento das concentrações em L-glutamato e NAD^+ .

Além disso, este novo método é relativamente rápido (1 hora), de aplicação e de utilização simples, e pouco dispendioso (cerca de 5€/ amostra). Por todas estas razões, pensamos que este novo método enzimático pode ser proposto como análise de rotina para a dosagem do ácido fumárico em enologia. ■

Financiamento: Este trabalho de investigação foi financiado pelo projeto CAVA No-FML (Operação 16.01.01 dos Projetos dos Grupos Operacionais, Programa de Desenvolvimento Rural (Regional) - Catalunha).

Extraído do artigo de investigação "New enzymatic method for estimating fumaric acid in wines" (Oeno One, 2021).

- 1 Resolution OENO-TECHNO 15-581A. OIV, International Organization of Vine and Wine (2021). *Summary of Resolutions Adopted in 2021 by the 19th General Assembly of the OIV - Paris (France)*. <https://www.oiv.int/public/medias/7577/en-resume-resolutions-oiv-paris-2020.pdf>
- 2 Commission Delegated Regulation (EU) 2022/68 of 27 October 2021. *Official Journal of the European Union* 19.1.2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32022R0068>
- 3 Fernández-Vázquez, D.; Rozès, N.; Canals, J.M.; Bordons, A.; Reguant, C.; Zamora, F. New enzymatic method for estimating fumaric acid in wines. *OENO One* 2021, 3, 273–281. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4825>