

TESTE ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM MOSTO DE UVA E VINHO

PRODUTO

Produto no. 4A126, para 30 testes, somente para uso *in vitro*.

CONTEÚDO

O kit inclui os seguintes reagentes:

N.º do reagente	Reagente	Preparação	Quantidade	Estabilidade
1	Buffer (tampão)	Não requer	33 mL	Os reagentes são estáveis por 12 meses a 4°C ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro. O Reagente 2 e o Reagente 4 são estáveis por 1 mês (Reagente 2) e 2 meses (Reagente 4) a 4°C uma vez dissolvidos ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro.
2	NADH	Adicione 1,7 mL de água destilada a qualquer frasco conforme necessário e misture para dissolver	2 x 1,7 mL	
3	MDH/LDH	Agite suavemente por inversão antes de usar	0.7 mL	
4	CL	Adicione 0,35 mL de água destilada a qualquer frasco conforme necessário e misture para dissolver	2 x 0.35 mL	
5	Padrão	Não requer	3.3 mL	

O prazo de validade do reagente 1 pode ser estendido colocando alíquotas em um freezer.

Não congele os reagentes 2, 3 e 4.

Não armazenar os reagentes na temperatura recomendada reduzirá sua vida útil.

Para a concentração do Padrão, consulte o rótulo do frasco.

Recomendações de segurança

- Use óculos de segurança
- Não ingerir Buffer (tampão) ou Padrão, pois eles contêm azida de sódio como estabilizador

PROCEDIMENTO

Parâmetros operacionais

Comprimento de onda	340 nm
Cubeta	1 cm, quartzo, sílica, metacrilato ou poliestireno
Temperatura	20 – 25°C
Volume final da cubeta	3,14 mL
Zero	contra o ar, sem a cubeta no feixe de luz

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras devem ser diluídas com água destilada para garantir que a concentração na solução não seja maior que 0,5 g/L. Para a maioria das amostras, uma diluição de 1 em 2 deve ser suficiente.

Para amostras com concentrações entre 1 g/L a 2,5 g/L de ácido cítrico, uma diluição de 1 em 5 seria apropriada.

Idealmente, A_{11} devem ser entre 0,90 - 1,20 unidades de absorbância.

Vinhos tintos não diluídos ou amostras de suco não diluído e altamente coloridas requerem descoloração.

Para descolorir, adicione aproximadamente 0,1 g de PVPP a 5 mL de amostra em um tubo de ensaio. Agite bem por cerca de 1 minuto. A clarificação é obtida por decantação ou filtragem através de papel de filtro Whatman No. 1.

ANÁLISE DA AMOSTRA

a. Pipete os seguintes volumes dos reagentes nas cubetas:

Reagente	Branco	Padrão	Amostra
1. Buffer (tampão)	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)
2. NADH	0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)
Água destilada	2,00 mL (2000 µL)	1,80 mL (1800 µL)	1,80 mL (1800 µL)
Amostra ou Padrão		0,20 mL (200 µL)	0,20 mL (200 µL)
3. MDH/LDH	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)

b. Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_1 após 5 minutos.

c. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

4. CL	0.02 mL (20µL)	0.02 mL (20µL)	0.02 mL (20µL)
-------	----------------	----------------	----------------

d Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_2 , após 25 minutos.

CÁLCULOS*

1. Calcule a Absorbância Líquida para o Branco, Amostra e Padrão:

$$\text{Absorbância Líquida, } A_L = A_1 - A_2$$

2. Calcule a Absorbância Corrigida subtraindo a Absorbância Líquida para o Branco da Absorbância Líquida para a Amostra:

$$\text{Absorbância Corrigida da Amostra, } A_C = A_L \text{ da Amostra} - A_L \text{ do Branco}$$

3. Faça o mesmo para o Padrão substituindo as absorbâncias do Padrão no lugar das absorbâncias da Amostra.

4. Calcule a quantidade de Ácido Cítrico na amostra usando a fórmula abaixo:

$$\text{Ácido Cítrico (mg/L)} = A_C \times 0.4787 \times \text{Fator de diluição}$$

* Uma planilha de cálculo está disponível para download em <https://www.vintessential.com.au/resources/calculation-worksheets/>

REFERÊNCIA

1. OIV, 2018, Compendium of international methods of wine and must analysis. *International Organisation of Vine and Wine*, Vol 1: Paris, France, pp. OIV-MA-AS313-09.