

TESTE ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO L-MÁLICO EM MOSTO DE UVA E VINHO

PRODUTO

Produto no. 4A160, 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	Todos os reagentes (conforme fornecido) são estáveis por 24 meses a 4°C ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro. O Reagente 2 (NAD) é estável por 1 ano a 4°C ou 2 anos a -20°C uma vez dissolvido ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro.
2	NAD	Adicione 6,6 mL de água destilada e misture até dissolver	6,6 mL	
3	GOT	Agite suavemente por inversão antes de usar	0.4 mL	
4	MDH	Agite suavemente por inversão antes de usar	0.4 mL	
5	Padrão	Não requer	3.3 mL	

O prazo de validade dos reagentes 1 e 2 pode ser estendido colocando alíquotas em um freezer.

Não congele os reagentes 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
- Reagente 1 é levemente corrosivo
- 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	2,22 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 0,4 g/L. Para amostras com menos de 2 g/L de ácido L-málico, uma diluição de 1 em 5 é suficiente. Como um guia geral, uma diluição adicional é necessária se a leitura de absorbância em A₂ for maior que 1 unidade de absorbância.

Vinhos tintos não diluídos ou amostras de suco não diluído altamente coloridas exigirão 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 sedimentação, centrifugação 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)
Água destilada	1.00 mL (1000 µL)	0.90 mL (900 µL)	0.90 mL (900 µL)
2. NAD	0.20 mL (200 µL)	0.20 mL (200 µL)	0.20 mL (200 µL)
3. GOT	0.01 mL (10 µL)	0.01 mL (10 µL)	0.01 mL (10 µL)
Amostra ou Padrão		0.10 mL (100 µL)	0.10 mL (100 µL)

b. Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_1 após 3 minutos.

c. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

4. MDH	0.01 mL (10µL)	0.01 mL (10µL)	0.01 mL (10µL)
--------	----------------	----------------	----------------

d Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_2 , após 10 minutos.

CÁLCULOS*

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

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

2. Calcule a Absorbância Corrigida (A_C) para o ensaio do Padrão subtraindo a Absorbância Líquida do Branco da Absorbância Líquida do Padrão:

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

3. Calcule a Absorbância Corrigida (A_C) para as amostras subtraindo a Absorbância Líquida para o Branco da Absorbância Líquida para a amostra:

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

4. Calcule a quantidade de Ácido L-Málico na amostra usando a fórmula abaixo:

$$\text{Ácido L-Málico (g/L)} = A_C \times 0.4725 \times \text{Fator de diluição}$$

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

5. Precisão (onde x é a concentração de ácido L-málico na amostra em g/L):

$$\text{Repetibilidade } r = 0,03 + 0,034x$$

$$\text{Reprodutibilidade } R = 0,05 + 0,071x$$

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-AS313-11.