

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

PRODUTO

Produto no. 4A130, 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)	Para ativar o Buffer, adicione o conteúdo do Reagente n.º2 Coenzimas (ATP/NADP) e misture por inversão até dissolver completamente	33 mL	Todos os reagentes (conforme fornecido) são estáveis por 18 meses a 4°C ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro. O Reagente 1 (Buffer) é estável por 6 meses a 4°C uma vez ativado ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro.
2	Coenzimas (ATP/NADP)		0,2 mL	
3	6-PGDH	Agite suavemente por inversão antes de usar	0.7 mL	
4	GNTK	Agite suavemente por inversão antes de usar	0.7 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
- 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	3,04 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 0,6 g/L. Para a maioria das amostras, uma diluição de 1 em 10 deve ser suficiente. Como um guia geral, uma diluição adicional é necessária se a leitura de absorbância for maior que 1 unidade de absorbância. As amostras podem ser usadas diretamente sem descoloração. Amostras turvas devem ser filtradas através de papel de filtro Whatman No. 1.

Para determinar o ácido D-glucônico total presente em sucos/mosto e vinhos, a D-glucono- δ -lactona deve primeiro ser hidrolisada ajustando o pH da amostra para 10-11 com 2M KOH e incubando por 5-10 minutos em temperatura ambiente. Ajuste o pH para 7,5-8,0 com 1M HCl antes do ensaio. A D-glucono- δ -lactona é convertida em ácido D-glucônico livre e é determinada junto com o ácido D-glucônico livre original (ácido D-glucônico total).

ANÁLISE DA AMOSTRA

a. Pipete os seguintes volumes dos reagentes nas cubetas:

Reagente	Branco	Padrão	Amostra
1. Buffer (tampão)/Coenzimas	1.00 mL (1000 μ L)	1.00 mL (1000 μ L)	1.00 mL (1000 μ L)
Água destilada	2.00 mL (2000 μ L)	1.90 mL (1900 μ L)	1.90 mL (1900 μ L)
3. 6-PGDH	0.02 mL (20 μ L)	0.02 mL (20 μ L)	0.02 mL (20 μ L)
Amostra ou Padrão		0.10 mL (100 μ L)	0.10 mL (100 μ L)

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

c. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

4. GNTK	0.02 mL (20 μ L)	0.02 mL (20 μ L)	0.02 mL (20 μ L)
---------	----------------------	----------------------	----------------------

d Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_2 , quando a reação estiver completa (aproximadamente 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 Gluconico na amostra usando a fórmula abaixo:

$$\text{Ácido Gluconico (g/L)} = A_c \times 0.9465 \times \text{Fator de diluição}$$

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

REFERÊNCIA

1. Barbe, J.C. *et al* 2002, Journal of Agricultural and Food Chemistry 11/2002; 50 (22) :pp. 6408-6412
2. Bergmeyer, H.U. *et al* 1984, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., vol. 6, pp. 220-227; Verlag Chemie, Weinheim.