

TESTE ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE D-GLICOSE E D-FRUTOSE EM MOSTO DE UVA E VINHO

PRODUTO

Produto no. 4A140, 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 g	
3	G6PDH/HK		0,7 mL	
4	PGI		0,7 mL	
5	Padrão		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 significativamente 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 1,0 g/L. Para a maioria das amostras, uma diluição de 1 em 10 deve ser suficiente.

Vinhos suaves podem exigir uma diluição de até 1 em 50, enquanto vinhos fortificados e de sobremesa podem exigir uma diluição de até 1 em 100 ou mais. Como um guia geral, uma diluição adicional é necessária se a leitura final de absorbância A_3 for maior que 1,2 unidades de absorbância.

As amostras podem ser usadas diretamente sem descoloração.

Amostras turvas devem ser centrifugadas ou filtradas através de papel de filtro Whatman No. 1 para clarificar.

ANÁLISE DA AMOSTRA

- a. Verifique se o reagente nº 1 (Buffer) foi ativado pela adição das coenzimas do reagente nº 2
b. Pipete os seguintes volumes dos reagentes nas cubetas:

Reagente	Branco	Padrão	Amostra
1. Buffer (tampão)/Coenzimas	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)
Água destilada	2,00 mL (2000 µL)	1,90 mL (1900 µL)	1,90 mL (1900 µL)
Amostra ou Padrão		0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)

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

d. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

3. G6PDH/HK	0.02 mL (20µL)	0.02 mL (20µL)	0.02 mL (20µL)
--------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

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

f. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

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

g. Misture bem e leia as absorbâncias, A_3 , após 10 minutos.

CÁLCULOS*

1. Calcule a Absorbância corrigida para D-Glicose:

$$\text{Absorbância de D-Glicose, } A_G = (A_2 - A_1) - (\text{Blank}A_2 - \text{Blank}A_1)$$

2. Calcule a concentração de D-Glicose da seguinte forma:

$$\text{Concentração de D-Glicose (g/L)} = A_G \times 0.8637 \times \text{Dilution Factor}$$

3. Calcule a correção da Absorbância para as amostras de D-Fructose:

$$\text{Absorbância de D-Fructose, } A_F = (A_3 - A_2) - (\text{Blank}A_3 - \text{Blank}A_2)$$

4. Calcule a concentração de D-Fructose da seguinte forma::

$$\text{Concentração de D-Fructose (g/L)} = A_F \times 0.8694 \times \text{Fator de diluição}$$

5. Adicione os resultados da D-Glicose e D-Fructose para obter a concentração total de açúcar residual.

6. Faça o mesmo para o Padrão, substituindo os valores de absorbância do Padrão pelos valores de absorbância da amostra.

* Uma planilha de cálculo está disponível para download em

<https://www.vintessential.com.au/resources/calculation-worksheets/>

7. Precisão (onde x é a concentração de D-Glicose ou D-Fructose na amostra em g/L):

$$\text{Repetibilidade } r = 0,056x \quad \text{Reprodutibilidade } R = 0,12 + 0,076x$$

REFERÊNCIA

1. "Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis" OIV, Vol 1, 2006, MA-E-AS311- 02-GLUFRU5, p4.