|  |  |
| --- | --- |
| Química 3: Química da Vida, Ambiente e Materiais | **10/ago/2019** |

**Prática 1**

**Hidrólise enzimática de polissacarídeos**

O objetivo desta aula é realizar a hidrólise enzimática de celulose e amido e analisar os produtos gerados por cromatografia em camada delgada.

1. **Materiais utilizados**

**Materiais por grupo (cada grupo deverá lavar o seu material antes da preparação):**

* 4 tubos tipo Falcon de 50 mL
* 1 estante para tubos os tubos
* 1 estante com ponteiras para pipeta automática P1000
* 1 estante com ponteiras para pipeta automática P200
* 1 pipeta automática P1000
* 1 pipeta automática P200
* 1 proveta de 50 mL
* 24 microtubos de 1,5 mL
* Isopor para gelo

**Materiais de uso geral:**

* pHmetro
* 4 banhos térmicos
* Centrífuga para microtubos
* Balança analítica
* Agitador Magnético

**Reagentes:**

* Acetato de sódio
* Celulase
* Amilase
* Amido
* Celulose
* Ácido clorídrico
* Ácido tricloroacético

1. **Procedimento experimental**

**Tampão acetato 100mM:**

Preparar tampão acetato 100 mM utilizando acetato de sódio e dividir o volume preparado em duas partes. Em uma das partes, acertar o pH em 4,5 para a reação com a celulase e na outra parte acertar o pH em 4,8 para a reação com a amilase.

**Ácido tricloroacético 50 %**

Preparar uma solução de ácido tricloroacético 50 % (m/V)

**2.1- Hidrólise enzimática**

- Hidrólise do amido:

1) preparo dos tubos para retirada de amostra: pegar dois microtubos de 1,5 mL e adicionar em cada um 20 L de ácido tricloroacético 50 %, identificar os dois tubos como sendo tempo zero (T0), sendo um deles para conter a hidrólise com amilase (tempo zero) e outro para o controle negativo. Manter estes microtubos em gelo.

2) preparo dos tubos de hidrólise: em dois tubos tipo Falcon de 50 mL, adicionar 0,75 g de amido de milho comestível. Em um dos tubos, adicionar 20 mL de tampão acetato pH 4,5 (identificar como sendo o tubo da hidrólise com amilase) e no segundo tubo (controle negativo), adicionar 25 mL do mesmo tampão (identificar como sendo o tubo de controle negativo para a hidrólise com amilase). Tampar os tubos e agitar vigorosamente. No tubo contendo 20 mL de tampão com amido (identificado como o tubo da hidrólise), adicionar 5 mL de amilase, tampar o tubo e agitar.

3) retirada de amostra do tempo zero: retirar de cada tubo tipo Falcon, uma amostra de 80 L e adicionar, respectivamente, sobre o ácido tricloroacético contido nos microtubos estocados no gelo. Os tubos tipo Falcon (reação e controle) deverão ser incubados em banho a 70 oC por 5 horas. A cada 1 hora os tubos deverão ser agitados (André).

**2.2. Hidrólise da celulose**:

**1)** preparo dos tubos para retirada de amostra: pegar dois microtubos de 1,5 mL e adicionar em cada um 20 L de ácido tricloroacético 50 %, identificar os dois tubos como sendo tempo zero (T0), sendo um deles para conter a hidrólise com celulase e outro para o controle negativo. Manter estes microtubos em gelo.

2) preparo dos tubos de hidrólise: Em dois tubos tipo Falcon de 50 mL, adicionar 0,75 g de papel picado. Em cada tubo, adicionar 35 mL de tampão acetato pH 4,8 e identificar um deles como sendo o tubo da hidrólise com celulase e o outro tubo será o controle negativo. Tampar os tubos e agitar vigorosamente. No tubo identificado como sendo o da reação de hidrólise, adicionar 70 L de celulase, tampar o tubo e agitar.

3) retirada de amostra do tempo zero: Retirar de cada tubo tipo Falcon, uma amostra de 80 L e adicionar, respectivamente, sobre o ácido tricloroacético contido nos microtubos estocados no gelo. Os tubos tipo Falcon (reação e controle) deverão ser incubados em banho a 50 oC por 5 horas. A cada 1 hora os tubos deverão ser agitados.

4) Retirada das amostras no tempo final: após 5 horas de hidrólise, adicionar 20 L de ácido tricloroacético 50 %, respectivamente em 4 microtubos de 1,5 mL, identificados como tempo final (T5) e além da identificação da hidrólise com amilase, controle negativo para amilase, hidrólise com celulase e controle negativo para celulase. Retirar os tubos tipo Falcon dos banhos térmicos, tomar 80 L de cada um e adicionar nos respectivos microtubos contendo o ácido tricloroacético. Em seguida, incubar estes microtubos por pelo menos 30 min em gelo. Durante este tempo, os microtubos referentes ao tempo T0, deverão ser centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm a 10 oC. Retirar os microtubos da centrífuga cuidadosamente e transferir 50 L do sobrenadante para um outro microtubo novo, previamente identificado. Guardar a alíquota de 50 L do sobrenadante em freezer com temperatura de -20 oC e descartar o restante.

Realizada esta etapa, todo o procedimento acima deverá ser realizado também com as amostras do tempo final (T5).

1. **Referências bibliográficas**

Carli et al. (2016). A novel thermostable and halotolerant xylanase from *Colletotrichum graminicola*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 133 (2016) S508–S517.