|  |  |
| --- | --- |
| Química 3: Química da Vida, Ambiente e Materiais | **17/ago/2019** |

**Prática** 2

**Revelação da cromatografia em camada delgada**

**e Fermentação alcoólica**

O objetivo desta aula é analisar a hidrólise enzimática de polissacarídeos, realizada na aula anterior, por meio de cromatografia em camada delgada. Num segundo momento realizar uma fermentação alcoólica com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

**1 - Materiais utilizados**

**Materiais por grupo:**

* Papel de mão para limpar a capela
* Papel higiênico
* 1 pisseta com água
* 1 erlen de 125 mL autoclavado (contendo meio de cultura)
* 3 tubos tipo Falcon de 15 mL autoclavados (1 tubo será para a montagem do sistema e 2 tubos para distribuir os brancos)
* 2 pinças de Mohr para montagem do sistema
* 1 elástico de borracha para montagem do sistema
* 1 rolha de borracha com 2 furos para erlen de 125 mL (as rolhas devem ser esterilizadas e conter dois tubos de plástico inseridos nos furos)
* 10 tubos tipo eppendorf de 1,5 mL (não precisa ser estéril)
* 8 tubos de ensaio grandes (para dosagem de açúcar)
* 1 cronômetro
* 1 pipeta graduada de 10 mL com pró-pipeta
* 1 béquer de 250 mL
* 1 tubo Falcon de 15 mL com 7 mL de DNS
* 1 micropipeta de 0,5-10 µL
* 1 micropipeta de 100-1000 µL
* Ponteiras para P10
* Ponteiras autoclavadas para P1000
* 1 estante para microtubos tipo eppendorf
* 1 estante para tubo de ensaio
* 1 béquer de 500 mL (será usado como cuba para cromatografia)
* Papel de filtro cortado em formato retangular 7 x 10 cm
* Placa de sílica para cromatografia em camada delgada 7,5 x 10 cm
* 1 bacia grande para gelo (deve caber estante para tubos de ensaio)
* Descarte para ponteiras

**Materiais e equipamentos de uso geral:**

* Fluxo laminar
* Autoclave
* Bico de Bunsen
* Banho maria a 97ºC com uma pinça de madeira (2)
* 1 proveta de 250 mL (autoclavada)
* 1 béquer de 250 mL contendo uma barra magnética (autoclavado)
* 2 erlens de 250 mL contendo 100 mL de meio YPG 2% (autoclavados)
* 3 erlens de 125 mL, contendo o tempo zero e brancos para análise em espectrofotômetro (autoclavados)
* 3 tubos tipo Falcon de 50 mL (autoclavados).
* 1 pipeta P10.000
* Ponteira para P10.000 (5 ponteiras autoclavadas)
* 1 pipeta P1.000
* Ponteiras para P1.000 (autoclavadas)
* Espectrofotômetro (3)
* Cubetas de plástico ou vidro (2 cubetas para cada espectrofotômetro)
* 1 béquer de 500 mL ao lado do espectrofotômetro para lavar as cubetas
* Balança analítica
* Incubadora com agitação e garras para erlens de 125 mL e de 250 mL
* Centrífuga refrigerada com rotor para microtubos
* Descarte para resíduo de DNS (béquer de 2 L)

**Reagentes**

* Peptona
* Extrato de levedura
* Glicose
* Celobiose
* Maltose
* Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
* Hidróxido de sódio
* Tartarato de sódio e potássio
* Ácido sulfúrico
* Etanol PA
* Acetato de Etila
* Ácido acético
* Ácido fórmico
* Orcinol

**Preparo da aula**

**Fase móvel para a cromatografia**

Preparar 250 mL da fase móvel para a cromatografia em camada delgada. A fase móvel é constituída por acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água deionizada nas proporções 9:3:1:4 (v/v/v/v), respectivamente.

**Reagente para revelação da placa cromatográfica**

 Para revelar a eluição dos carboidratos nas placas de cromatografia em camada delgada, utilizar uma solução de orcinol 0,4 % (m/v) em ácido sulfúrico fumegante e álcool etílico 1:9 (v/v), respectivamente.

**Solução do reagente de DNS**

Adicionar 300 mL de NaOH 2 mol/L (24 g de NaOH para 300 mL de água) em um béquer de 1000 mL. Dissolver vagarosamente 300 g de tartarato de sódio e potássio nessa solução. Separadamente, dissolver em um béquer de 1000 mL, em banho a 65°C, 10 g de DNS em 200 mL de água. Colocar a solução de tartarato de sódio e potássio na solução de DNS (no banho), vagarosamente e com agitação constante. Completar o volume para 1000 mL com água deionizada. Guardar em um frasco escuro.

Obs.: O NaOH não pode estar vencido.

**Meio YPG 2% (*Yeast Extract-Peptone Medium*)**

Preparar 1000 mL de meio YPG 2%. Durante o experimento cada grupo utilizará 1 alíquota de 80 mL em erlen de 125mL. Para uso geral deverá ter uma alíquota de 80 mL em erlen de 125 mL para o tempo zero de fermentação, uma alíquota de 72 mL sem adição de glicose e sem inóculo em erlen de 125 mL (branco para a dosagem de açúcar) e duas alíquotas de 100 mL em erlens de 250 mL para servirem de pré-inóculos.

Extrato de Levedura – 10,0 g

Peptona – 10,0 g

H2O qsp – 900 mL

Dividir em 2 porções de 90 mL em erlen de 250 mL (pré inóculo), 9 porções de 72 mL em erlen de 125 mL e o restante (sobra) em erlen de 250 mL.

A glicose deve ser preparada separadamente em água autoclavada e será esterilizada por filtração em filtro 0,22m novo e estéril.

**Solução de glicose 20%\***

 Deverá ser preparada 150 mL de água deionizada em erlem de 250 mL, esterilizada em autoclave. Também deverão ser autoclavados um béquer de 250 mL contendo uma barra magnética e uma proveta de 250 mL. Estes materiais serão utilizados na preparação da glicose 20 %.

Glicose – 24 g

H2O qsp – 120 mL

Após a dissolução total da glicose, a solução deverá ser esterilizada por filtração em filtro 0,22m novo e estéril. A filtração será realizada com seringa de 60 mL nova e estéril ou esterilizada por 15 min em luz UV no fluxo laminar. O filtrado será recolhido em tubos tipo Falcon de 50 mL autoclavados.

(\*) Misturar a solução de Glicose 20% ao meio de cultura no momento do uso. Os volumes correspondentes para este preparo são, 10 mL de glicose 20 % em cada erlen com 90 mL de meio e 8 mL de glicose 20% nos erlens com 72 mL de meio, com exceção de um deles, que será o branco para a dosagem de glicose (Tabela 2).

**2 - Procedimento experimental**

**2.1 - Cromatografia em camada delgada de carboidratos**

 Para realizar esta cromatografia, serão utilizados os produtos de hidrólise enzimática do amido e do papel (celulose) da aula anterior. A fase estacionária será uma placa de silica-gel G-60 10 × 7,5 cm, DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, Germany.

 - Preparação da cuba cromatográfica: adicionar 40 mL da fase móvel em um béquer de 500 mL com fundo plano (cuba de eluição). Adicionar uma folha de papel de filtro 10 x 7 dentro da cuba, em contato com o solvente para promover uma saturação uniforme do vapor da fase móvel e tampar a cuba com filme plástico. Quando o papel de filtro estiver totalmente umedecido com a fase móvel, fixar o papel na parede interna do béquer. Deixar a cuba tampada enquanto se realiza a aplicação das amostras na placa.

- Aplicação das amostras na placa: usar a figura abaixo como exemplo.

7,5 cm

10 cm

1,5 cm

**.**

**.**

**.**

**.**

**.**

**.**

**.**

Marcar com lápis na placa, a partir da extremidade inferior, dois pontos nas extremidades externas a uma altura de 1,5 cm. A marcação deve ser realizada suavemente sem remover sílica da placa. Colocar uma régua alinhando os dois pontos e marcar sete pontos para aplicação das amostras a uma distância de 1 cm cada um. O primeiro ponto será marcado a uma distância de 0,5 cm a partir da borda externa esquerda. Nos sete pontos marcados, serão aplicados em cada um, seguindo a ordem da esquerda para a direita de acordo com a tabela abaixo.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Amostra | Celobiose padrão | Hidrólise Amido | Controle negativo hidrólise (A) | Maltose padrão | Glicose padrão | Hidrólise celulose | Controle negativo Hidrólise (C) |
| Volume (L) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 8 | 8 |

**Discussão**

De acordo com os resultados obtidos, discuta os produtos obtidos e a partir deles o tipo de atividade enzimática que deveria conter os extratos enzimáticos brutos.

Estes hidrolisados estariam aptos a serem fermentados?

**2.2 - Fermentação alcoólica**

O pré-inóculo deverá ser lançado com 16 horas de antecedência (será utilizada levedura de padaria). Para aulas com 4 horas de duração, o inóculo deverá ser realizado com 3 horas de antecedência.

A partir da levedura mantida em meio sólido YPG 2%, (nesta aula foi utilizada levedura de panificação) fazer dois pré-inóculos usando alça de platina, em 100 mL de meio líquido YPG 2% contido em erlens de 250 mL. Deixar em agitação orbital a 200 rpm por um período de 16 h a temperatura de 30 °C.

Inocular um total de 10% (v/v) (8 mL) do pré-inóculo em 80 mL de meio líquido YPG 2% contido em erlenmeyer de 125 mL. Após o inóculo, retirar uma alíquota de 3 mL, que corresponde à amostra no tempo zero. Tampar o erlen com rolha de borracha (preparar um sistema com mangueiras e tubo falcon com água para evitar trocas gasosas com o ambiente durante a fermentação (Figura 1). Incubar as culturas de levedura em shaker a 180 rpm e 30 °C por 6 h.

Cada grupo receberá uma alíquota de 1 mL do meio YP (sem glicose) sem inóculo, para usar como branco na determinação de açúcares redutores\*.

 (\*) usar amostras do meio diluídas 25X (tempo 0h) e 2 vezes (tempo 6h).

A fermentação ocorrerá em incubadora com agitação orbital a 180 rpm, à temperatura de 30°C. Para o tempo de 6h de fermentação, cada grupo deverá retirar 3 mL de amostra em microtubos de 1,5 mL e armazenado imediatamente em gelo. Em seguida centrifugar as amostras a 5.000 rpm por 5 min a 6°C

Ponta de conexão da seringa para retirada de amostra (abrir a pinça somente depois que conectar a seringa)

Tubo de alívio da pressão. Este tubo deve ser fechado com a pinça antes de ser removido da água. Após a sua remoção da água, a amostra pode ser sugada com a seringa.

Após a retirada da amostra, a ponta de conexão com a seringa deve ser fechada com a pinça, a seringa removida, o tubo de alívio da pressão deve ser colocado de volta na água e em seguida a pinça que está fechando este tubo deve ser removida.

Figura 1: Sistema experimental para fermentação etanólica

A quantificação da glicose será realizada pela reação do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), cuja a curva analítica está fornecida a seguir: 

Para a amostra do tempo 6 h, a diluição deverá ser de 2 vezes. A dosagem de açúcares redutores deverá ser em triplicata (seguir os dados na Tabela 2), colocando os tubos em banho com água fervente por 5 min, após a adição do reagente de DNS. Retirar os tubos do banho quente, colocar no gelo por cerca de 2 min e adicionar em seguida 10 mL de água destilada. Ler a absorbância em 540 nm (zerar o espectro com o teste realizado na amostra de meio YP sem glicose).

Dados obtidos a partir das análises de açúcares redutores por DNS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Tubos | Amostra (mL) | Solução de DNS (mL) | Absorbância(540 nm) | Concentração de glicose\* (mg/L) |
| Branco(meio YP diluído 25 X) | 0,75 | 1,50 | ------------------------------- | -------------------- |
| 0 h (diluído 25 X) | 0,75 | 1,50 |  | Média |  |
|  |
|  |
| Branco(meio YP diluído 2 X) | 0,75 | 1,50 | ------------------------------- | -------------------- |
| 6 h(diluído 2 X) | 0,75 | 1,50 |  | Média |  |
|  |
|  |

Usar curva padrão de glicose para a quantificação dos açúcares redutores.

**Discussão:**

A quantidade de etanol gerado durante a fermentação será determinada por estequiometria da reação.



De acordo com o seu resultado de quantificação de glicose, qual seria o máximo de etanol que poderia ser obtido?

**Procedimentos finais**

 Todos os descartes devem der colocados em seus respectivos lugares, os quais serão indicados no laboratório. Os microtubos tipo eppendorf e as ponteiras deverão ser descartados em seus respectivos frascos de descarte. As pipetas automáticas deverão ser limpas com papel umedecido em etanol 70 % ao final do experimento e deixadas nas respectivas capelas de cada grupo. Todos os demais materiais e vidrarias deverão ser lavados e guardados nos locais indicados.

**4 - Referências bibliográficas**

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia:* Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher. 2001.

PELCZAR JR., J.M.; CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Vol.1 e 2. Ed. São Paulo, Makron Books. 1996. 524p.