

SEPARAÇÃO DE AÇUCARES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

Objetivos:

- a) Ilustrar um método usado para separação e identificação de açúcares por cromatografia em camada fina.

Considerações:

A cromatografia em camada fina é um método de separação essencialmente micro analítico, que se baseia em diferentes partições, do tipo líquido-líquido, dos componentes de uma mistura sobre um suporte de sílica gel.

O fenômeno é, predominantemente de partição, embora outros fenômenos como a adsorção e a troca iônica também possam ocorrer em menor intensidade.

Os componentes básicos da cromatografia em papel são:

- a) **fase estacionária:** formada pelo sistema água-sílica, que resulta da adsorção das moléculas de água pela sílica, através de pontes de hidrogênio entre os grupos hidrofílicos da sílica e as moléculas de água.
- b) **fase móvel:** normalmente constituída de um solvente ou um sistema de solventes orgânicos de baixa polaridade.
- c) **Suporte sólido:** constituído pela placa de sílica, com características adequadas à cromatografia.

Durante o processo, a fase móvel passa sobre a sílica em contato íntimo com a fase estacionária, com a qual é imiscível, provocando uma partição contínua dos componentes da mistura entre as duas fases.

Material:

- a) Câmaras cromatográficas (béquer de 250 ml)
- b) Placa de sílica. (10 x 6 cm)
- c) Sistema de solventes: acetato de etila: ácido acético: propanol: ácido fórmico: água (25:10:5:1:15)– volume final de 11,2 ml
- d) Padrões: xilooligossacarídeos (XOS) xilose, xilobiose, xilotriose e xilotetrase.
- e) Amostra : escolher de acordo com a prática anterior
- f) Pipeta automática 20 microlitros
- g) Solução reveladora: 1,8 g de N(1-Naftil)-etileno diamina dihidroclorato em 200 mL de etanol, sob agitação magnética constante para dissolução, seguida da adição lenta de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado
- h) Estufa a 100 °C
- i) Plástico filme

Procedimento:

a) Preparo da cuba cromatográfica

Adicionar 12 ml de fase móvel para realização da corrida e tampar com plástico filme. Deixar equilibrar por, no mínimo, 10 minutos. Em seguida, inserir a placa cromatográfica com as amostras e padrões aplicados.

b) Preparo da placa cromatográfica

Marcar a placa com auxílio de lápis de tal forma a ter 6 pontos equidistantes a 1 cm da extremidade inferior da placa. Identificar cada marcação em que serão aplicadas as amostras.

c) Aplicação das amostras e dos padrões

Aplicar, em quatro pontos, 2µL (microlitros) do padrão. Evitar que o diâmetro das aplicações ultrapasse 5 mm. Em seguida, aplicar as amostras desconhecidas, da mesma forma que os padrões.

d) Corrida cromatográfica

Deixar a corrida cromatográfica ocorrer por cerca de uma hora ou até alcançar a marca feita para o final da corrida. Em seguida, remover a placa e secar em estufa a 60°C por cerca de 5 minutos.

e) Revelação

- Verter a solução reveladora na placa de sílica. Deixar secar ao ambiente e posteriormente em estufa a 100°C por aproximadamente 5 min.
- Delimite o contorno de cada mancha com um lápis.
- Meça as distâncias do ponto de origem aos centros das manchas e calcule os valores de Rf.
- Identifique, comparando com os valores de Rf dos padrões os açúcares da amostra.

Enquanto a amostra estiver se desenvolvendo na câmara cromatografica iniciar a parte 2 da pratica.

PARTE 2 - Determinação das constantes cinéticas

Objetivo Geral : Determinar as constantes cinéticas da xilanase comercial (luminase) em diferentes substratos

grupo 1 – xilana de bagaço de cana

grupo 2 - xilana de oat spelts (10% arabinose, 15% glicose e 75% xilose)

grupo 3 xilana de beechwood (85% de xilose , 9,4% de acido uronico e 6,9% de outros açucares)

Os estudos cinéticos serão realizados nas condições ótimas de catálise para determinação dos valores aparentes de Vmax, Km, kcat, através do ajuste da regressão não linear da curva usando a equação de Michaelis-Menten. Outros modelos poderão ser empregados dependendo do comportamento cinético de cada enzima.

Reagentes :

Xilana

Suspensão de xilanase (luminase) (diluida 1.000 vezes)

Solução de xilana 1%, preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8

Reativo do ácido 3, 5 dinitrosalicílico

Objetivo:

- 1) Verificar a influência do fator concentração de substrato sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática

- 2) Calcular graficamente k_m e V_{max} . Testar todos os métodos de linearização e comparar os valores.

Procedimento:

Volume da solução de xilana (microlitros)	Volume de tampão (microlitros)	Banho-maria a 50 °C	Solução de enzima (microlitros)	Incubação a 50 °C	DNS (mililitros)	Concentração de substrato (%)
18	882	1 min	100	5 min	1,5	0,02
45	855	1 min	100	5 min	1,5	0,05
90	810	1 min	100	5 min	1,5	0,1
112,5	787,5	1 min	100	5 min	1,5	0,2
225	675	1 min	100	5 min	1,5	0,25
450	450	1 min	100	5 min	1,5	0,5
900	0	1 min	100	5 min	1,5	1

Se não for observado um platô no gráfico, será necessário aumentar a concentração de substrato