

Fotossíntese

Reacção de Hill:

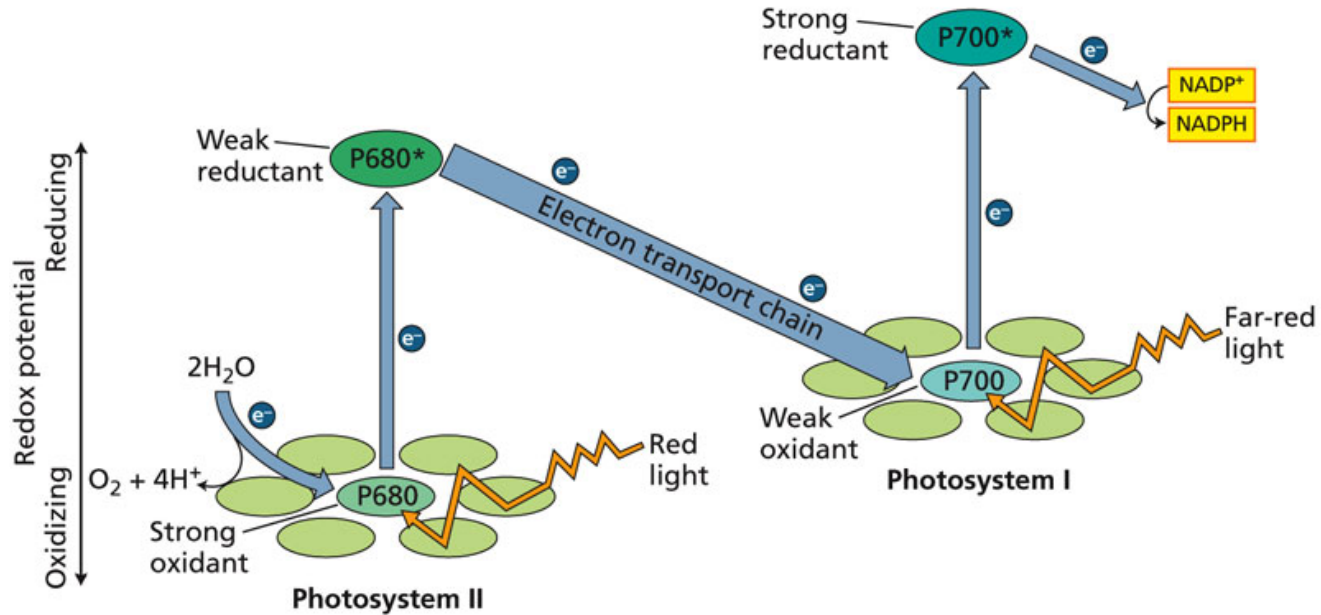
- A fotossíntese como um processo de oxidação-redução
- A água como dador de electrões para as reacções fotoquímicas da fotossíntese
 - A produção de NADPH e ATP depende da luz

Anos 30...

Será a fotossíntese oxigénica um processo de oxidação-redução?

Se sim, qual o dador de electrões? CO_2 ? H_2O ?

Como saber?



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 7.14 © 2006 Sinauer Associates, Inc.

Leaf extracts rich in chloroplasts, when radiated, evolve oxygen and acquire the capacity to reduce hydrogen acceptors

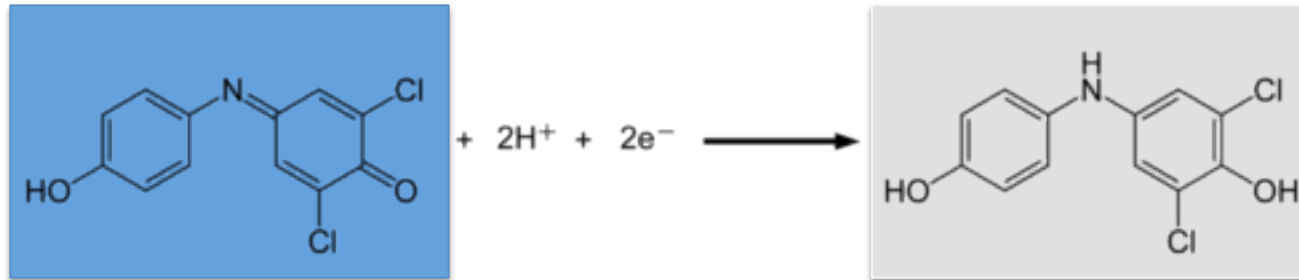
Robert Hill, 1937

Objectivos:

- **Preparar** tilacoides a partir de cloroplastos
- **Aprender** técnicas de estudo de transporte electrónico: uso de aceitadores artificiais de electrões (e-)
- **Perceber** o modo de actuação de alguns herbicidas
- **Determinar** a taxa de transporte electrónico do PSII

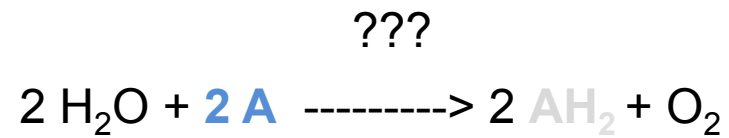
Reagente de Hill: um indicador do transporte de electrões porque o seu estado redox determina a sua cor

DCPIP: 2,6-dichlorophenol-indophenol



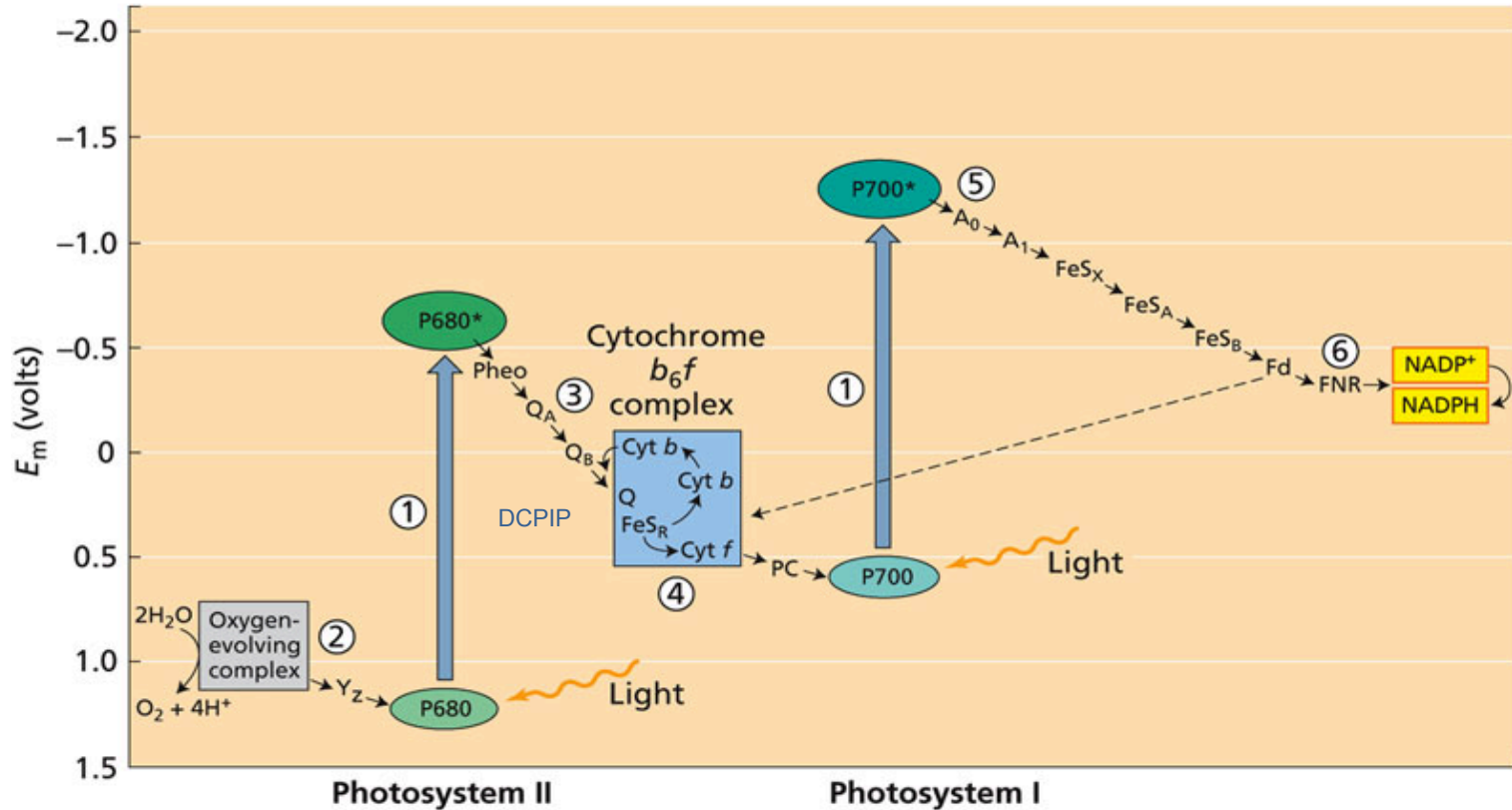
Oxidado
Azul

Reduzido
Incolor



Como determinar a taxa de transporte de e- ao nível do PSII?

Esquema em Z: cadeia fotossintética de transporte de e- em organismos oxigénicos

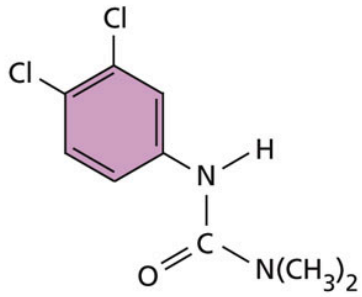


DCPIP tem um potencial de oxidação-redução (E_m) próximo do da plastoquinona.

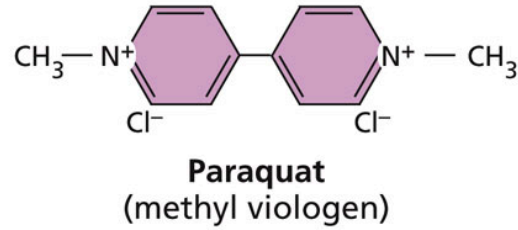
PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 7.21 © 2006 Sinauer Associates, Inc.

Herbicidas: estrutura; local de actuação

(A)



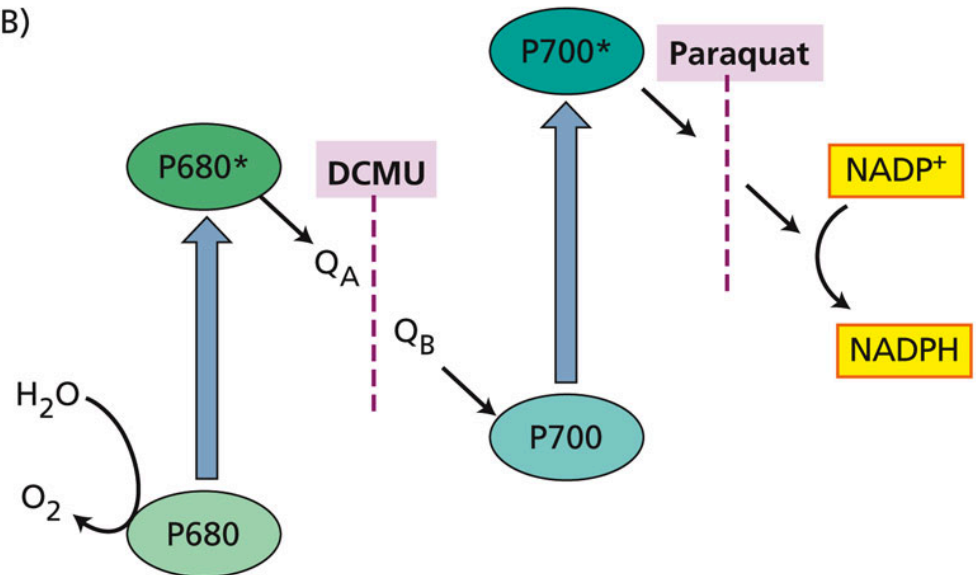
DCMU (diuron)
(dichlorophenyl-dimethylurea)



Paraquat
(methyl viologen)

(B)

PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 7.30 (f)



Reacção de Hill

A fotossíntese como um processo de oxidação-redução

INTRODUÇÃO

A libertação de oxigénio e a formação de NADPH e ATP na fotossíntese estão dependentes de reacções de oxidação-redução catalisadas pelas cadeias transportadoras de electrões existentes nas membranas dos tilacoides.

A demonstração da existência deste processo de oxidação-redução foi feita por Robert Hill, em Cambridge, em 1937.

Usando cloroplastos isolados na presença de aceitadores artificiais de electrões (ferricianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ou 2,6-diclorofenol-indofenol, DCPIP), Hill verificou que, após iluminação, os aceitadores eram reduzidos, com simultânea libertação de O_2 , de acordo com a seguinte equação:



PROCEDIMENTO

1. Reagentes

- Meio de homogeneização: tampão MOPS 20 mM, **pH 7,8** e **0,4 M de sacarose**.
- Meio de ensaio ou reacção: tampão MOPS 20 mM, **pH 6,5** e 0,06 mM de **DCPIP**
- **DCMU** (Dicloro-fenil-dimetil-ureia) 10 mM.

2. Extracção de cloroplastos (4°C)

- Lave folhas de *Spinacea oleracea* com água destilada, seque o excesso de água e remova as nervuras principais. Pese **cerca de 1 g** e anote o peso.
- Esmague o material vegetal num almofariz com cerca de 2 mL de meio de homogeneização semi-gelado. Lave com mais 1 mL de meio de homogeneização semi-gelado.
- **Filtre** através de duas camadas de gaze. Distribua o filtrado por dois microtubos.
- Centrifugue a **5000 g**, durante 2 minutos.
- **Despreze** os sobrenadantes e **lave** cada sedimento cuidadosamente com 1mL de meio de homogeneização.
- Repita a centrifugação a **5000 g**, durante 2 minutos.
- **Ressuspenda** os sedimentos em apenas **0,5 mL de meio de homogeneização**. Repare que o total de cloroplastos obtidos a partir 1 g de folha ficam em 0,5 mL.
- Mantenha a suspensão de cloroplastos a baixa temperatura.

3. Ensaio

- Retire o meio de reacção, com DCPIP, do frio e mantenha à temperatura ambiente.
- Prepare quatro tubos de ensaio, ou macro *cuvettes* de plástico (3 mL) de acordo com o indicado na tabela 1, excepto os cloroplastos. Envolver todos os tubos em papel de alumínio para permanecerem em escuridão até ao início do ensaio com a adição dos cloroplastos.
- Adicione a cada tubo ou *cuvette* (3 mL) os cloroplastos e misture por inversão, sem agitar.
- Ilumine os tubos durante **5 minutos**, mantendo os tubos 1 e 4 envolvidos em papel de alumínio.
- Observe e registre na tabela as **alterações de cor** verificadas durante a reacção.
- Páre a reacção, colocando todos os tubos em escuridão.
- Leia a absorvância de cada um dos tubos ou *cuvette* **a 620 nm**.

RESULTADOS

Tabela 1. Efeito da luz na redução de aceitadores artificiais de electrões (DCPIP) por cloroplastos isolados.

Células ou <i>cuvetes</i> (3mL)	1	2	3	4
Luz	Sim	Não	Sim	Não
Meio de ensaio (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0
DCMU (mL)	-	-	0,5	0,5
H ₂ O (mL)	0,5	0,5	-	-
Cloroplastos (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05
Absorvância a 620 nm				
$\Delta A_{\text{Esc-Luz}}$				

1. Determine a taxa de redução do DCPIP em μmol de DCPIP reduzido $\text{hr}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$, sabendo que o coeficiente de absorção molar (ϵ) do DCPIP a 620 nm é $20 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
2. Explique qual o papel do DCPIP e do DCMU.
3. A expressão da taxa de redução do DCPIP por peso fresco de material vegetal está sujeita a erros.
 1. Qual será o erro mais relevante?
 - a) Que outras unidades poderia utilizar para exprimir esta taxa?

Problema

1. Isolaram-se cloroplastos a partir de 1 g de folhas de espinafre (Peso Fresco, PF) em 5 mL de tampão de homogeneização. Após várias lavagens os cloroplastos foram ressuspensos em 500 μL do mesmo tampão. Dessa suspensão retiraram-se 100 μL de cloroplastos que foram adicionados a 4 mL de tampão de ensaio contendo diclorofenolindofenol (DCPIP), um aceitador artificial de electrões, tendo-se iniciado imediatamente a iluminação dessa amostra. Após 5 minutos, verificou-se que a absorvância decrescera 0.5 unidades relativamente ao valor inicial.

1.1 Tendo em conta que o coeficiente de absorção molar (ϵ) do DCPIP a 620 nm é $20 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, podemos afirmar que seriam reduzidos por hora _____ μmol DCPIP (indique o valor calculado).

1.2 Com base nos dados disponíveis, podemos calcular a taxa de redução do DCPIP, que é _____ $\mu\text{mol DCPIP h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ (indique o valor calculado).

Bom trabalho 😊