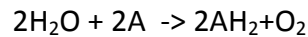


## Reacção de Hill

### A fotossíntese como um processo de oxidação-redução

#### FUNDAMENTO TEÓRICO

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 aceptadores artificiais de electrões (ferricianeto,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  ou 2,6-diclorofenolindofenol, DCPIP), Hill verificou que, após iluminação, os aceptadores eram reduzidos, com simultânea libertação de  $\text{O}_2$ , de acordo com a seguinte equação:



#### PROCEDIMENTO

##### 1. Reagentes

- ✓ Meio de homogeneização: tampão MOPS 20 mM, pH 7,8, contendo 0,4 M de sacarose.
- ✓ Meio de ensaio ou de reacção: tampão MOPS 20 mM, pH 6,5, contendo 0,06 mM de DCPIP (diclorofenol-indofenol)
- ✓ DCMU (Diclorofenil-dimetil-ureia) 10 mM.

##### 2. Extracção de cloroplastos (4°C)

- ✓ Remova as nervuras principais de uma ou duas folhas de *Spinacea oleracea*. Pese cerca de 1 g e anote o peso.
- ✓ Esmague o material vegetal num almofariz pré-arrefecido com 2 mL de meio de homogeneização semi-gelado. Filtre através de duas camadas de gaze e recolha o filtrado num tubo graduado.
- ✓ Lave o almofariz com mais 1 mL de meio de homogeneização semi-gelado e filtre também.
- ✓ Distribua todo o filtrado por dois microtubos e centrifugue a 5000 g x 2 minutos.
- ✓ Despreze os sobrenadantes e lave cada sedimento cuidadosamente com 1mL de meio de homogeneização.
- ✓ Repita a centrifugação a 5000 g x 2 minutos e despreze os sobrenadantes.
- ✓ Ressuspenda os cloroplastos (sedimentos) em apenas 0,5 mL de meio de homogeneização, de modo 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.

## 2 | TYPE THE DOCUMENT TITLE

- ✓ Prepare quatro macro *cuvettes* de plástico (3 mL) de acordo com o indicado na tabela 1, excepto os cloroplastos. Envolve todos os tubos em papel de alumínio para permanecerem em escuridão até ao início do ensaio.
- ✓ Adicione a cada *cuvette* os cloroplastos e misture por inversão, sem agitar.
- ✓ Inicie a reacção com a iluminação durante 2 a 5 minutos, caso seja respectivamente luz solar ou iluminação artificial, mantendo os tubos 2 e 4 envolvidos em papel de alumínio.
- ✓ Observe e registe na tabela as alterações de cor verificadas durante a reacção.
- ✓ Leia a absorvância de cada um dos tubos a 620 nm e registe os valores.
- ✓ Registe as diferenças das absorvâncias entre o tubo 1 e os restantes.

## 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 <sub>2</sub> O (mL)	0,5	0,5	-	-
Cloroplastos (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05
Absorvância a 620 nm				
$\Delta A_{Esc-Luz}$				

1. Determine a taxa de redução do DCPIP em  $\mu\text{mol}$  de DCPIP reduzido  $\text{hr}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ , sabendo que o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) 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.
  - a) Qual será o erro mais relevante?
  - b) Que outras unidades poderia utilizar para exprimir esta taxa?

## BIBLIOGRAFIA

Taiz L, Zeiger E and Moller (2015). *Plant Physiology and Development*, 5<sup>th</sup> ed., Sinauer Ass. Inc, New York, USA

Walker D A, 2002 '*And whose bright presence*'- an appreciation of Robert Hill and his reaction, *Photosynthesis Research* 73: 51-54,