

## PRÁTICA Nº. 3.4

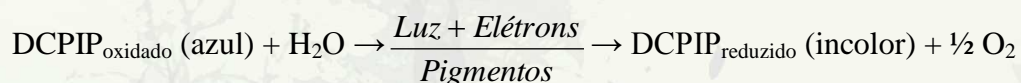
FORMAÇÃO DE PODER REDUTOR EM CLOROPLASTOS ISOLADOS  
(REAÇÃO DE HILL)

## INTRODUÇÃO

A fotossíntese é um processo físico-químico que envolve uma série de reações de oxirredução, nas quais moléculas de água são oxidadas e de CO<sub>2</sub> são reduzidas. Essas reações ocorrem em presença de luz e contam com a participação dos pigmentos fotossintéticos, principais constituintes das “antenas” dos fotossistemas. Os fotossistemas são complexos proteicos pigmentados que se localizam nos tilacoides, conjunto de membranas imersas nos estromas (matrizes) dos cloroplastos. As moléculas de água são oxidadas pela ação da luz, liberando o O<sub>2</sub> no processo conhecido como fotoxidação ou fotólise da água. A fotoxidação da água é muito importante para a fotossíntese, uma vez que os fótons de energia radiante estimulam a realização de reações redox em carreadores de elétrons e nas clorofilas especiais, pigmentos que fazem parte da cadeia de transporte de elétrons (CTE) dos cloroplastos. No processo, a água atua como agente redutor, fornecendo elétrons que repõem os elétrons perdidos por componentes intermediários da CTE. A luz estimula o funcionamento da CTE, importante etapa da fase fotoquímica da fotossíntese, que tem como receptor final de elétrons moléculas de NADP<sup>+</sup> (forma oxidada) que, por sua vez, são reduzidas a NADPH+H<sup>+</sup>. Esse poder redutor (NADPH+H<sup>+</sup>) é fundamental para redução das moléculas de CO<sub>2</sub> a açúcares na fase bioquímica da fotossíntese. Paralelamente à formação do NADPH+H<sup>+</sup> e como consequência do fluxo de elétrons na CTE, moléculas de ATP também são formadas, o que ocorre em resposta à dissipação do gradiente de potencial eletroquímico formado entre o estroma e o lúmen dos tilacoides (força próton-motora).

A comprovação dos fenômenos de fluxo de elétrons em sistemas biológicos somente é possível com a utilização de determinados artifícios. Quando submetidos a condições adequadas de iluminação, cloroplastos isolados são capazes de realizar essas reações. Isso foi descoberto por Robert Hill, em 1937, ao observar que cloroplastos isolados produziam oxigênio quando iluminados em presença de oxalato férrico. Sob o efeito da luz, o oxalato passava para a forma reduzida (ferrosa), atuando, portanto, como um agente oxidante. Mais tarde foram descobertos outros compostos, como as quinonas e certos corantes, que também podiam atuar como “oxidantes de Hill”. Essa reação ficou conhecida como “Reação de Hill”.

Um desses compostos é o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), capaz de detectar baixos níveis da atividade de Hill e mudar da cor azul (quinona), quando oxidado, para incolor (fenol) ao ser reduzido, conforme reação a seguir:



## OBJETIVOS

Demonstrar, indiretamente, o funcionamento da CTE e a formação de poder redutor (NADPH+H<sup>+</sup>) em cloroplastos isolados e iluminados, utilizando um corante de oxido-redução (DCPIP).

## MATERIAIS

- Solução de DCPIP a  $2,5 \times 10^{-4}$  M (PM: 290,8 g/L; Preparo: DCPIP<sub>oxidado</sub> - 0,0073 g/100 mL)



- Tubos de centrífuga



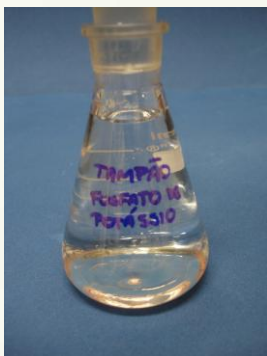
- Cristais de ácido ascórbico



- Béqueres de 200 mL



- Tampão fosfato de potássio 0,4 M, pH 6,8 (Preparo:  $K_2HPO_4$  - 34,034 g/L +  $KH_2PO_4$  - 27,844 g/L)



- Tubos de ensaio pequenos



- Centrífuga refrigerada



- Pipetas de 1 e 2 mL



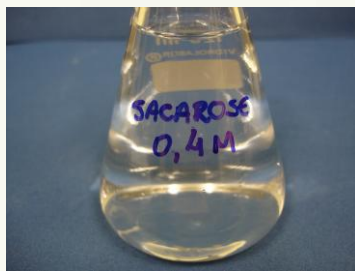
- Folhas de beijo, fumo, espinafre, etc.



- Homogenizador ou liquidificador



- Sacarose 0,4 M (preparo: 136,92 g/L)



- Banho de gelo



- Funil de vidro



- Lâmpada refletora de 100-150 W





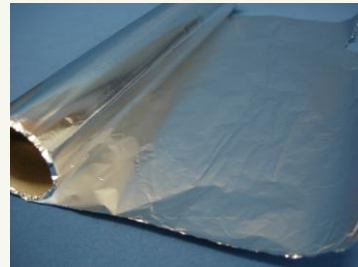
- Gaze



- Pinça



- Papel-alumínio



## PROCEDIMENTOS

Utilizando um liquidificador, homogenize 20 g de folhas de beijo (*Impatiens balsamina* L., Balsaminaceae) em 100 mL de uma solução gelada de sacarose 0,4 M, preparada em tampão fosfato, pH 6,8, durante dois minutos. Para a obtenção dos cloroplastos também podem ser utilizadas folhas de fumo, espinafre e taiobão, dentre outras espécies. Filtre o homogenato através de quatro camadas de gaze, recolhendo o filtrado em tubos de centrifuga mantidos em banho de gelo. Centrifugue o filtrado a 200 rpm, por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Colete o sobrenadante e centrifugue-o novamente, por 10 minutos, a 1000 rpm. Despreze o sobrenadante e ressuspenda o precipitado na mesma solução preparada anteriormente. Os cloroplastos estarão prontos para serem utilizados na aula. Todo o material a ser utilizado (vidrarias e soluções) deve ser previamente resfriado em congelador e mantido em banho de gelo durante a extração e na execução da aula.

Separe quatro tubos de ensaio pequenos enumerando-os de 1 a 4. Adicione 0,5 mL da suspensão de cloroplastos nos tubos 1, 2 e 3. Adicione 3,0 mL de água no tubo 1 e 0,5 mL ao tubo 4. Em seguida, adicione 3,0 mL da solução de DCPIP<sub>oxidado</sub> (azul) aos tubos 2, 3 e 4. Anote as cores iniciais de cada amostra nos tubos de ensaio. Envolve o tubo 3 em papel alumínio. Exponha o conjunto de tubos a uma fonte de luz por um período de 5-10 minutos e, após esse intervalo, anote os resultados, considerando as cores finais observadas em cada um dos tubos.

Após esses procedimentos, acrescente um cristal de ácido ascórbico aos tubos 3 e 4. Anote e interprete os resultados. Para explicar os resultados, considere que o potencial redox do DCPIP<sub>oxidado</sub> encontra-se em torno de 0,22 Volts (próximo ao valor do potencial redox do citocromo b6/f), e o potencial redox do ácido ascórbico equivale a 0,0 Volt.