

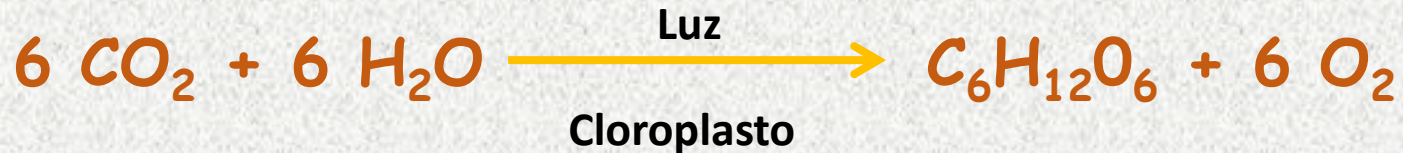
Economía del carbono

TP N° 5:

Reacción de Hill



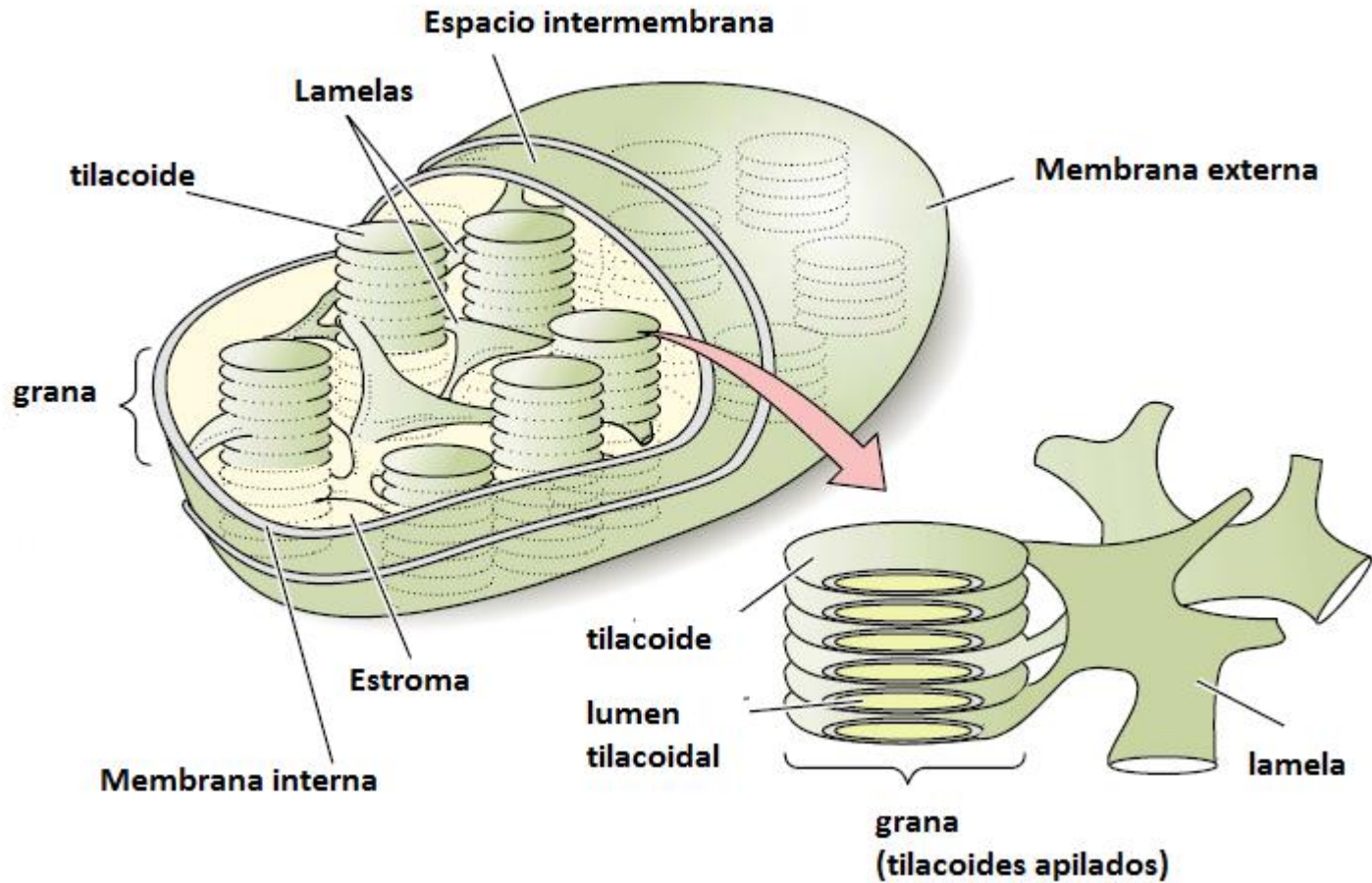
Ecuación general de la fotosíntesis



- Es una reacción endergónica: necesita un aporte externo de energía (luz) para ocurrir.

- Es una reacción redox : el H_2O se oxida (=cede electrones) a O_2 y el CO_2 se reduce (=acepta electrones) a hidrato de carbono.

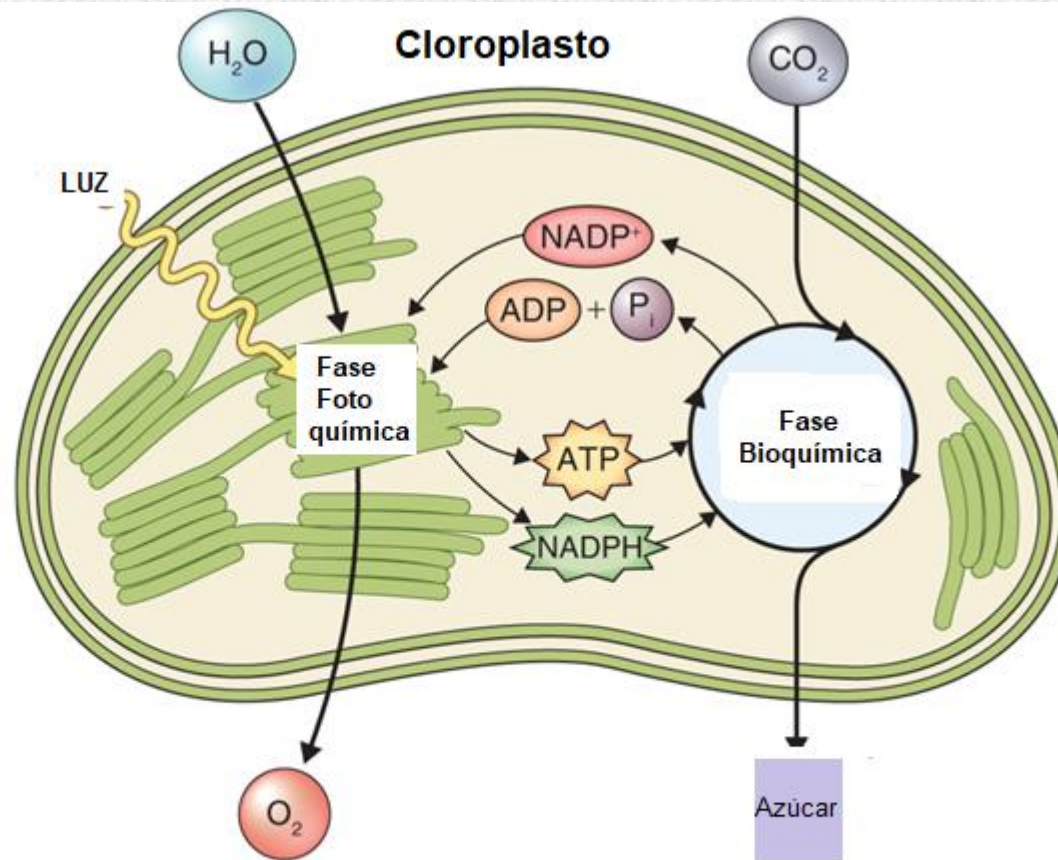
Estructura del cloroplasto



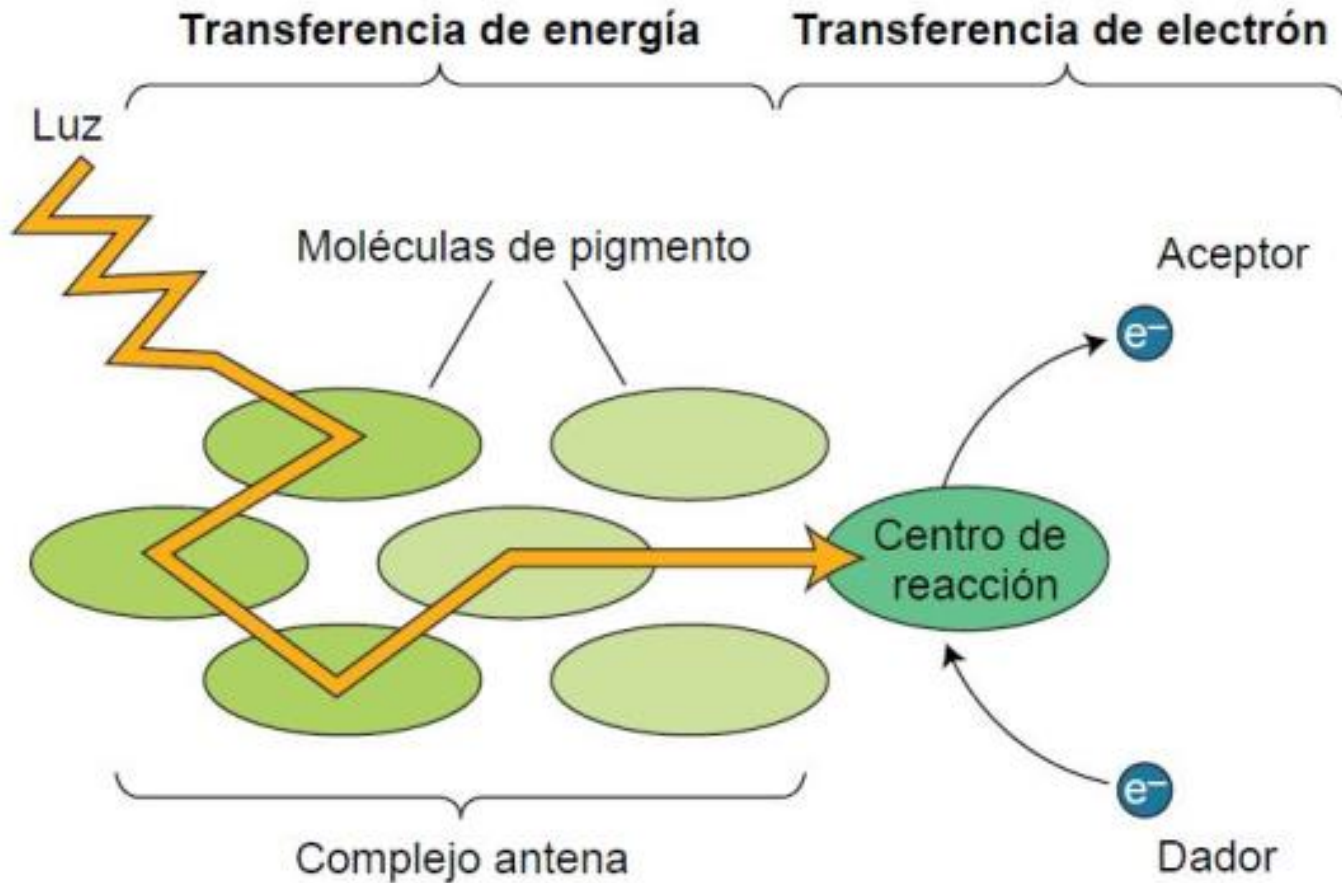
Etapas de la fotosíntesis en el cloroplasto:

Fase Fotoquímica (Tilacoides)

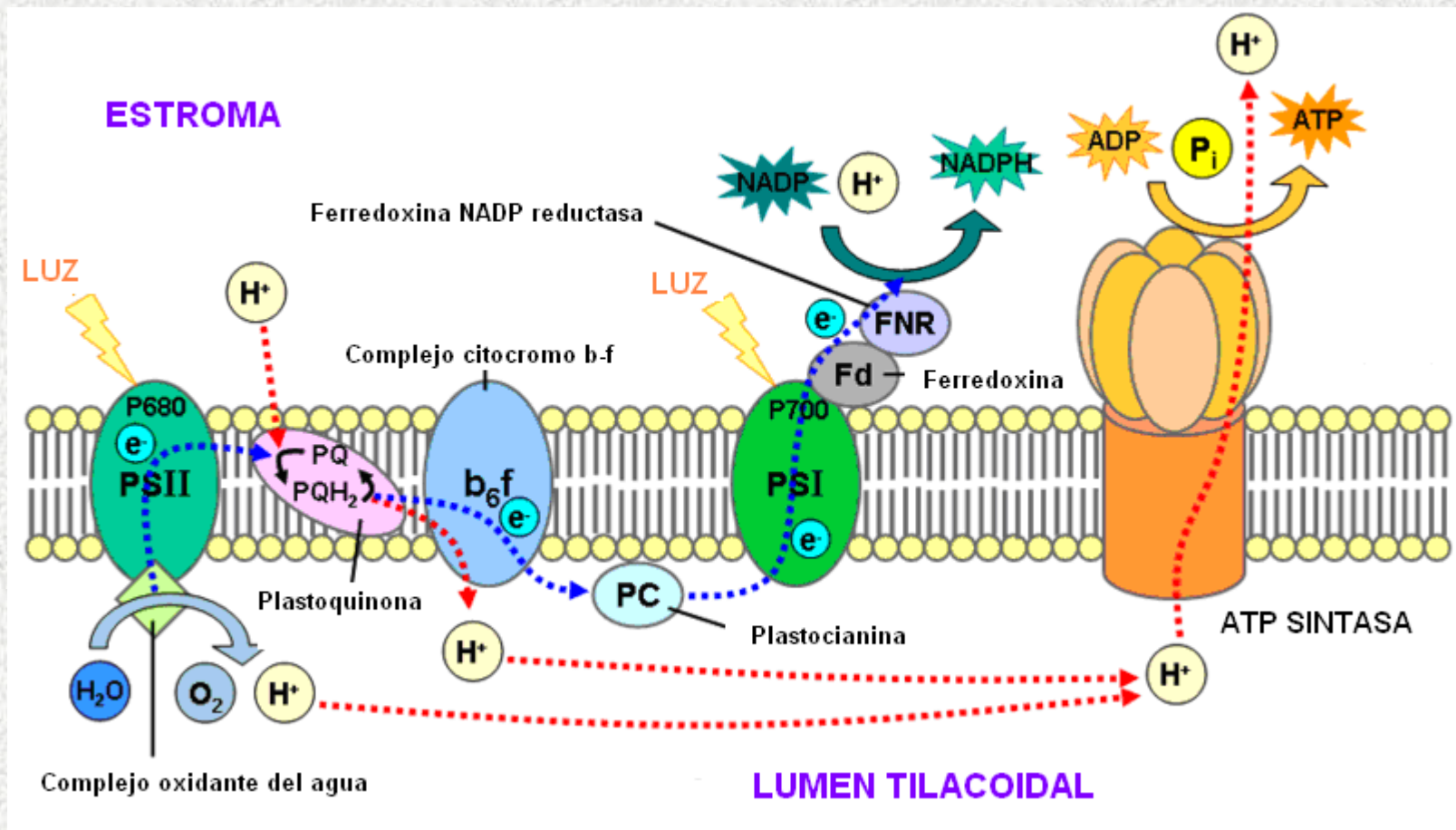
Fase Bioquímica (Estroma)



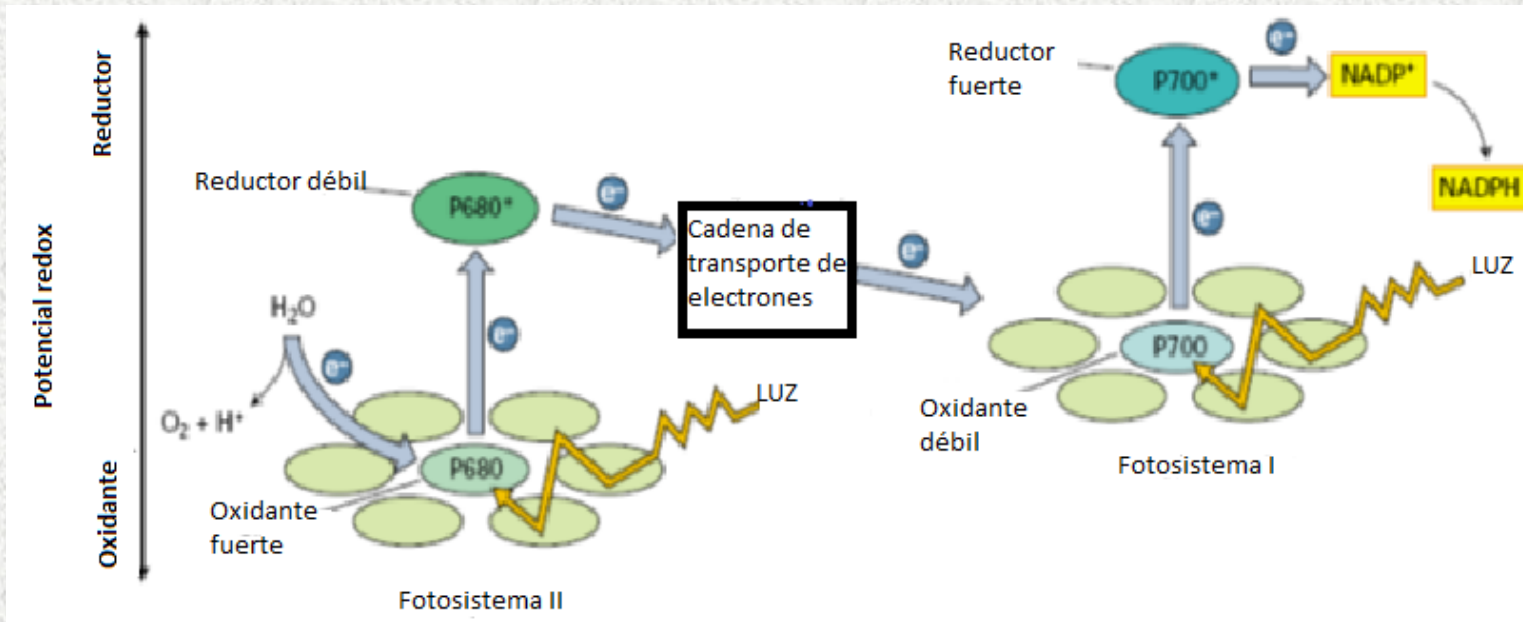
FOTOSISTEMA: formado por clorofilas y proteínas que absorben luz



Cadena de transporte de electrones simplificada de la membrana tilacoidal entre el fotosistema II (PS2) y el fotosistema I (PSI):
citocromo bf, plastoquinona (móvil) y plastocianina (móvil).



Etapa lumínica: Esquema Z de la fotosíntesis



#Al absorber luz, el fotosistema II produce un oxidante fuerte (que oxida al agua) y un reductor débil (que reduce al fotosistema I).

#Al absorber luz, el fotosistema I produce un reductor fuerte (que reduce al $NADP$) y un oxidante débil (que oxida al fotosistema II).

Algunos componentes de la cadena de transporte de electrones bombean protones creando un gradiente entre el estroma y el lumen tilacoidal que impulsa la síntesis de ATP

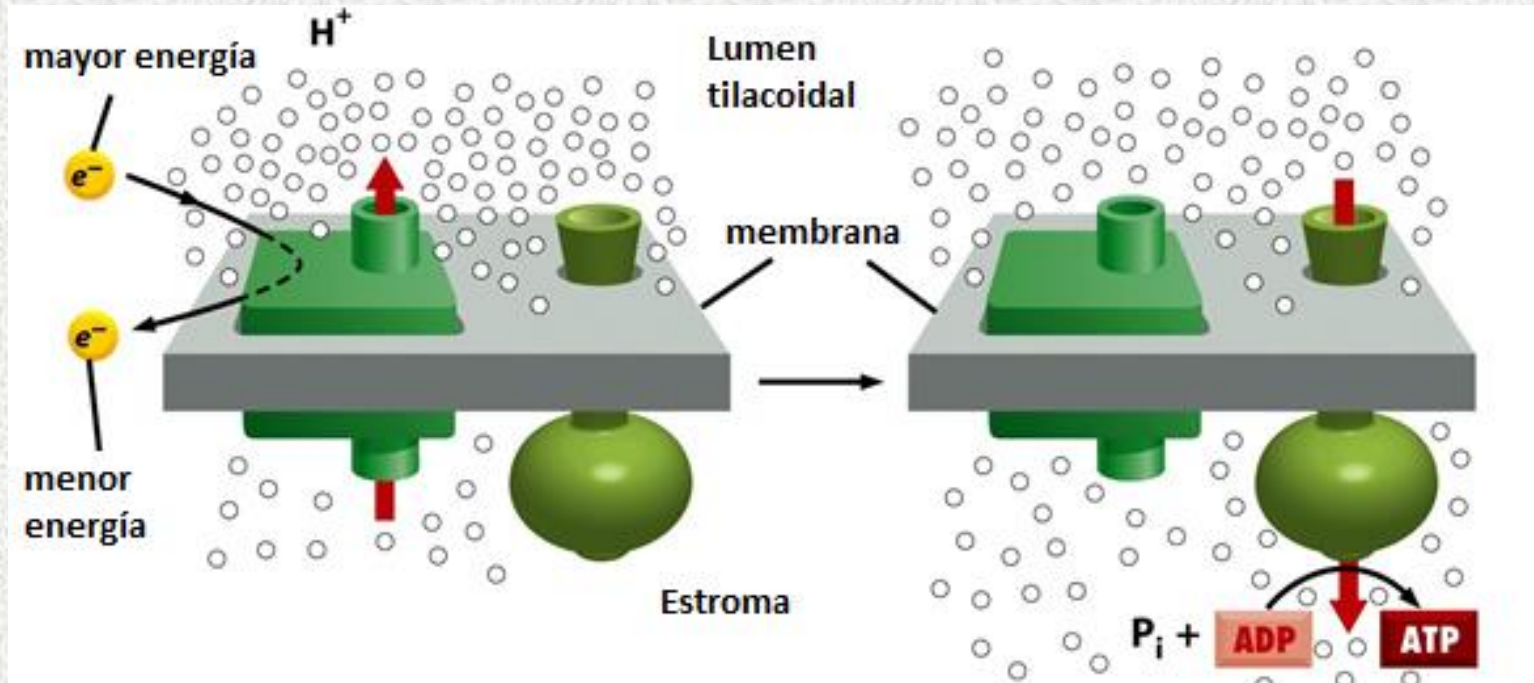
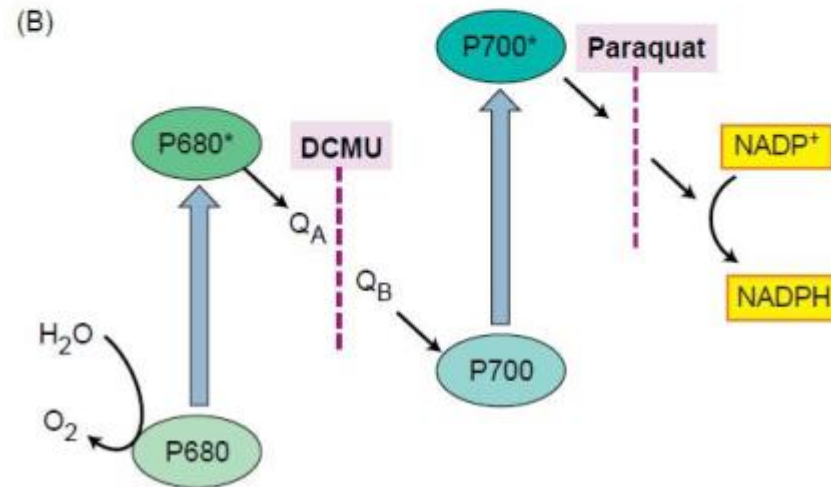
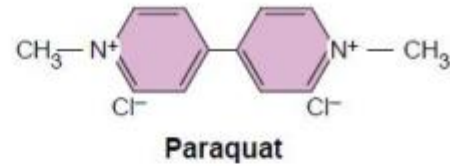


Figure 14-1 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Algunas sustancias bloquean la cadena de transporte de electrones



En 1937, Robert Hill demostró que una suspensión de cloroplastos aislados puede producir O_2 en presencia de luz, si se suministra un compuesto oxidado capaz de aceptar los electrones procedentes de la fotólisis del agua.

Estos aceptores artificiales de electrones reemplazan al aceptor natural: el NADP.

Hill demostró que el CO_2 no participa directamente en la fase lumínica.

Materiales

- Minipimer
- Lámpara
- Mechero Bunsen
- Vasos de precipitado, probetas y embudo
- Pipetas y pipetas Pasteur de diferentes tamaños
- Papel de aluminio
- Gradillas y tubos de ensayo
- Rotulador
- Malla de nylon para filtrar
- Centrífuga refrigerada
- Tubos de centrífuga
- Solución de sacarosa 0,5 M
- Solución de DCPIP 0,1%
- Buffer de reacción pH 7
- DCMU
- Hojas de acelga o espinaca



Obtención de la suspensión de cloroplastos: el procedimiento debe realizarse a 4°C.

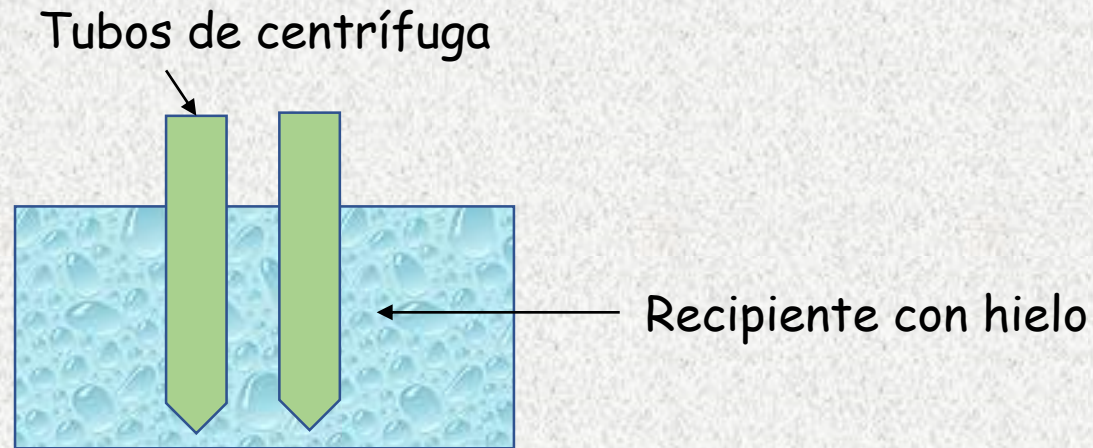


1. Se homogeneizan 10 g de hojas de espinaca en 50 ml de solución de sacarosa 0,5M a 4 °C, con minipimer durante 20 segundos.

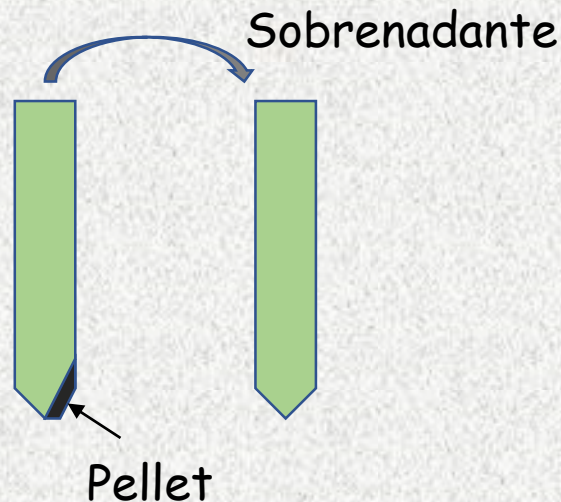
Obtención de la suspensión de cloroplastos: el procedimiento debe realizarse a 4°C.



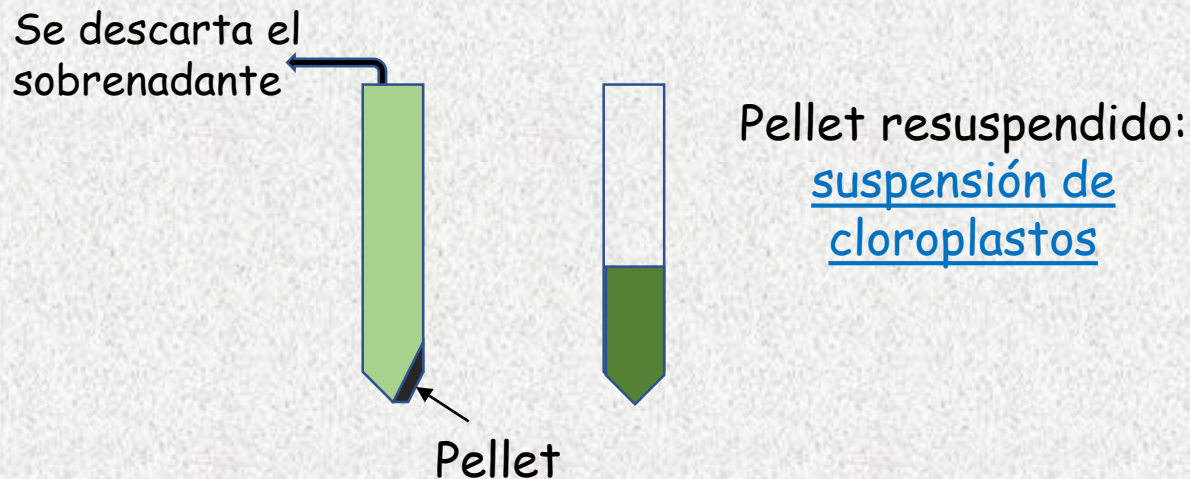
2. El homogeneizado se filtra (para eliminar los restos de mayor tamaño) con malla de nylon.



3. El filtrado se transfiere a tubos de centrífuga. Se centrifuga a baja velocidad (600 rpm, 5 minutos, a 4°C) para precipitar células y restos de mayor tamaño que los cloroplastos. Se descarta el pellet y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.



4. Se centrifuga a 3000 rpm, 5 minutos, a 4 °C. En el pellet queda una mezcla de cloroplastos intactos y tilacoides (liberados de cloroplastos rotos).
5. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en una solución de metanol 15%. Esta es la suspensión de cloroplastos con la que vamos a trabajar.



Para la reacción se preparan tubos de ensayo con los siguientes tratamientos:

Tubo	Suspensión de Cloroplastos	Buffer de reacción	Calor ¹	Oscuridad ²	DCMU	DCPIP
1	2 ml	5 ml	Si	No	No	0,1 ml
2	2 ml	5 ml	No	Si	No	0,1 ml
3	2 ml	5 ml	No	No	No	0,1 ml
4	2 ml	5 ml	No	No	1mg	0,1 ml
5	2 ml	5 ml	No	No	No	No

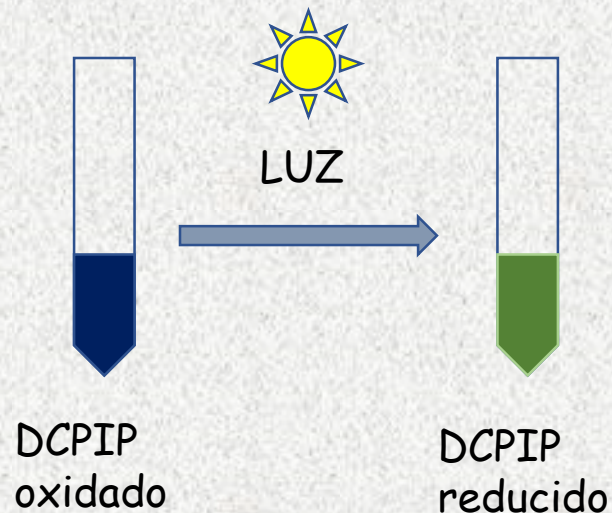
1: Se colocan 2 ml de suspensión de cloroplastos en un tubo de ensayo y se calientan a ebullición en la llama del mechero.

2: El tubo se cubre con papel de aluminio.

#Cuando se agrega DCPIP, el tubo es de color azul.

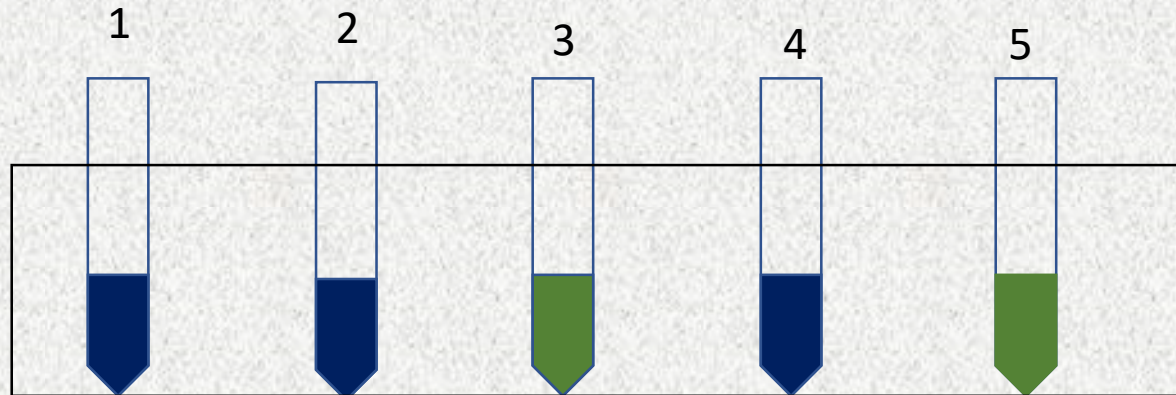
#Si se ilumina el tubo y la reacción ocurre, el DCPIP se reduce y se vuelve incoloro, y el color azul desaparece.

#Este cambio de color se observa a simple vista y permite visualizar la reacción.



Los tubos se colocan en una gradilla y se iluminan durante 5 minutos, con una irradiancia igual o superior a $200 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Resultados para cada tubo luego de 5 minutos de iluminación



1. Completar el cuadro indicando si la reacción se produce en cada tubo (=si desaparece el color azul). En las Conclusiones, explicar por qué ocurre (o no) la reacción en cada tubo, en base a los tratamientos aplicados en cada caso.

TUBO	Reacción (si o no)	Observaciones
1		
2		
3		
4		
5		

2. ¿Por qué para obtener la suspensión de cloroplastos hay que trabajar a 4 °C?

3. ¿Cuál le parece que es la finalidad del tubo 5?

4. ¿Por qué se agrega una solución buffer a la reacción?
5. ¿Qué ocurriría con el tubo 2 si se quita el papel de aluminio?
6. ¿Cuál sería el mecanismo por el cual el DCMU actúa como herbicida?

En este TRABAJO PRACTICO la Reacción de Hill se evalúa en forma cualitativa (si ocurre o no).

La Reacción de Hill se puede determinar también en forma cuantitativa, midiendo la absorbancia del DCPIP a 590 nm con un espectrofotómetro.

Redactar el informe y enviarlo al docente a cargo de su comisión por e-mail.

Para consultas /dudas contactarse por e-mail con el docente.