

01/06/96

MÉTODOS ANALÍTICOS E LABORATORIAIS EM FISILOGIA VEGETAL

LEÔNIDAS P. PASSOS

Embrapa

06.00737

Métodos analíticos e

1996

LV-2006.00737



35358-1

**MÉTODOS ANALÍTICOS E
LABORATORIAIS EM
FISIOLOGIA VEGETAL**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro

Arlindo Porto Neto

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretoria

Dante Daniel G. Scolari
Elza Angela Battaggia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE GADO DE LEITE

Chefe Geral

Airdem Gonçalves de Assis

Chefe Adjunto de Pesquisa

Terezinha Padilha

Chefe Adjunto de Desenvolvimento

Luiz Gomes de Souza

Chefe Adjunto de Apoio Administrativo

Aloisio Teixeira Gomes



ISBN 85-85748-08-7

**MÉTODOS ANALÍTICOS E
LABORATORIAIS EM
FISIOLOGIA VEGETAL**

Leônidas P. Passos

Coronel Pacheco - MG
- 1996 -

Exemplares deste livro podem ser adquiridos na:
EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Rodovia MG 133 - km 42
36155-000 Coronel Pacheco, MG
Fone: (032) 215-8550 - Ramal 169 Telex: (32) 3157
Fax: (032) 215-8550 - Ramal 175

COMITÊ LOCAL DE PUBLICAÇÕES

Terezinha Padilha - Presidenta
Maria Salete Martins - Secretária
Deise Ferreira Xavier
José Renaldi Feitosa Brito
Leônidas P. Passos
Luiz Gomes de Souza
Maurílio José Alvim
Nilson Milagres Teixeira

Embrapa	
Unidade:	<i>Ai - Seale</i>
Valor aquisição:
Data aquisição:
N.º N. Fiscal/Fatura:
Fornecedor:
N.º OCS:
Origem:	<i>Jocaci</i>
N.º Registro:	<i>00737/06</i>

ARTE, COMPOSIÇÃO E DIAGRAMAÇÃO

Leônidas P. Passos
Mary Esmeralda Marinho da Silva
Rodrigo de Rezende Stambassi (estagiário)
Marcelo Rodrigues de Araújo (estagiário)

REVISÕES

Linguística
Newton Luís de Almeida

Bibliográfica
Maria Salete Martins
Margarida Maria Ambrosio

Editorial
Matheus Bressan

ISBN 85-85748-08-7

PASSOS. L.P. ***Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal.***
Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223p.

Fisiologia vegetal; Métodos analíticos; Laboratoriais.

CDD. 581.1

© EMBRAPA, 1996

SUMÁRIO

Apresentação	i
Agradecimentos	iii
Abreviaturas e Símbolos	v
Símbolos de Unidades	xi
1. Introdução	1
2. Normas Gerais para o Laboratório	3
3. Soluções e Concentrações	9
4. Centrifugação	15
5. Espectrofotometria	19
6. Separações Cromatográficas	25
7. Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida	33
8. Proteínas - Análise Quantitativa	41
9. Aminoácidos - Análise Quantitativa e Qualitativa	49
10. Carboidratos - Análise Quantitativa	53
11. Extração de Pigmentos e Estimativa do Teor de Clorofila	67
12. Reação de Hill em Cloroplastos Isolados	73
13. Ácidos Nucléicos - Extração e Determinação	77
14. RNA - Extração e Fracionamento	81
15. DNA Genômico - Extração pelo Tampão CTAB	87
16. Polirribossomos - Análise Quantitativa	91
17. Lipídios - Extração e Detecção	95
18. Solução Nutritiva de Hoagland	101
19. Xilema - Análise da Exsudação	107
20. Pulso de Calor	111
21. Potencial Iônico da Membrana Celular - Determinação	113
22. Transpiração	117
23. Relações Hídricas I - Psicrometria de Termopar	125
24. Relações Hídricas II - Bomba de Pressão	129
25. Relações Hídricas III - Sonda de Pressão	137
26. Respiração - Determinação em Mitocôndrios Isolados	145
27. Fotorrespiração - Estimativa	147
28. Fotossíntese e Fluorescência da Clorofila <i>a</i> - Medição	151
29. Enzimas I - Purificação da Fosfatase Ácida	159
30. Enzimas II - Atividade da ATPase na Membrana Citoplasmática	163
31. Enzimas III - α -Amilase	165
32. Enzimas IV - Nitrato Redutase	171
33. Enzimas V - Eletroforese de Isozimas em Gel de Amido	177
34. Síntese de Amido	183
35. Hormônios - Ensaio e Purificação	187
Apêndice A - Fatores para Conversão de Unidades.....	195
Apêndice B - Tópicos Metodológicos Complementares	199
Apêndice C - Lista de Fornecedores	207
Tabela Periódica dos Elementos.....	211
Índice Remissivo.....	213

APRESENTAÇÃO

O despertar do século XXI acena com profundas modificações tecnológicas, cujos primeiros indícios têm se revelado pelos avanços nas técnicas científicas. Para o País torna-se cada vez mais estratégico dispor de metodologias que permitam o acesso à pesquisa analítica e ao conhecimento científico.

Com o livro **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**, o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Embrapa/CNPGL) procura contribuir para a disseminação das técnicas empregadas nos estudos de fisiologia vegetal. Embora adotadas no laboratório de Fisiologia de Plantas Forrageiras do CNPGL, elas podem ser úteis a outros laboratórios e sobretudo ao ensino da fisiologia vegetal, tanto em nível de graduação quanto de pós-graduação.

O autor é engenheiro-agrônomo formado pela U.F.V. em 1975. Tem M.Sc. em fitotecnia, também pela U.F.V. em 1978. Coursou o doutorado em fisiologia vegetal na University of Arizona, obtendo o título de Ph.D. em 1989. É Pós-Doctor em Biologia Molecular pela mesma Universidade, em 1993.

Este documento vem preencher uma lacuna importante nos estudos de forrageiras no Brasil. Será de utilidade a pesquisadores, professores, estudantes e profissionais afins.

Airdem Gonçalves de Assis
Chefe Geral

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a apresentação das idéias e métodos descritos neste livro. Em particular, as análises do texto feitas por Maria Coletta Vidigal, Maria Aparecida Vasconcelos de Paiva e Brito e Matheus Bressan foram cruciais para a organização da obra. As sugestões apresentadas por José Roberto Ferreira, José Ladeira da Costa, José Luiz Oliveira da Silva e Heloísa Carneiro em muito enriqueceram o texto.

O apoio dado pela equipe de editoração da Área de Difusão e Transferência de Tecnologias e pelo Setor de Informação da Embrapa/CNPGL foram também fundamentais para a finalização do trabalho.

A chefia da Embrapa/CNPGL, incentivou a feitura deste livro em todos os momentos.

Não poderia deixar de mencionar a compreensão, tolerância e paciência de minha esposa Yacyra e dos meus filhos Marcelo, Ricardo, Weber e Marcos, durante as longas horas que me dediquei a esta obra.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A ₂₅₄	absorbância a 254 nm
A ₂₆₀	absorbância a 260 nm
ABA	ácido abscísico
Ac	actínio
ADH	desidrogenase alcoólica
Ag	prata
álcool isoamil	3-metil-1-butanol
Al	alumínio
Am	amerício
AMP, ADP, ATP	adenosina 5'-mono-, di- e trifosfato
Ar	argônio
As	arsênico
ASA/ISO	velocidade (de reação com a luz) do filme fotográfico
At	astato
ATPase	adenosina 5'-trifosfatase
Au	ouro
azul de bromofenol	3',3'',5',5''-tetrabromofenol-sulfonaftaleína
B	boro
Ba	bário
Bc	berílio
BGG	plasma gama-globulina bovina
Bi	bismuto
Bk	berquílio
BL	<i>boundary layer</i> (resistência da camada de ar do contorno)
BME	2-mercaptoetanol
Br	bromo
BSA	soroalbumina bovina
C	carbono
Ca	cálcio
Cd	cádmio
Ce	cério
Cf	califórnio
chloramine-T	p-tolueno-sulfocloramida de sódio
Cl	cloro
clor a	clorofila <i>a</i>
clor b	clorofila <i>b</i>
CM	carboximetil
Cm	cúrio
CNETs	carboidratos não estruturais totais
CNPGL	Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Co	cobalto
Cr	cromo
Cs	césio
CTAB	mistura alquiltrimetil - brometo de amônio
Cu	cobre
DC	<i>direct current</i> (corrente direta)

DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
d.e.	diâmetro externo
DEAE	dietilaminoetil
Δ	variação em
DGDG	digalactosil-diacil-glicerol
d.i.	diâmetro interno
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitol
Dy	disprósio
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EM	espectrometria de massa
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Er	érbio
Es	einstênio
Eu	európio
ex.	por exemplo
F	flúor
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
Fe	ferro
FIA	<i>flow injection analysis</i> (análise por injeção de fluxo)
Fm	férmio
FR	fotorrespiração
Fr	frâncio
FS	fotossíntese
f/s	<i>f/stop</i> (escala inversa de abertura da lente fotográfica)
GA	giberelina
Ga	gálio
GC	cromatografia gasosa
Gd	gadolínio
GE	gravidade específica
Ge	germânio
G-1-P	glicose-1-fosfato
guanidina	aminometanamidina
H	hidrogênio
He	hélio
HFPES	ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanossulfônico
Hf	háfnio
Hg	mercúrio
Ho	hólmio
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
I	iodo
IAA	ácido indolacético
IgG	imunoglobulina G
In	índio
Ir	irídio

IRGA	analisador infravermelho de gás
K	potássio
K_m	constante de Michaelis
Kr	criptônio
La	lantânio
LED	<i>light emitting diode</i> (fotodiodo)
Li	lítio
Lr	laurêncio
Lu	lutécio
>	maior que
<	menor que
Md	mendelévio
MES	ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico
Mg	magnésio
MGDG	monogalactosil-diacil-glicerol
Mn	manganês
Mo	molibdênio
mRNA	RNA mensageiro
MS	matéria seca
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
MTT	brometo de difeniltetrazólio
MV	matéria verde
N	nitrogênio
Na	sódio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
Na ₂ EDTA	EDTA sal dissódico
Nb	nióbio
Nd	neodímio
Ne	neônio
Ni	níquel
ninidrina	hidrato de tri-ceto-hidrindeno
NMR	ressonância nuclear magnética
No	nobélio
Np	neptúnio
NR	nitrito redutase
O	oxigênio
OAc	acetato
orcinol	5-metilresorcinol; 3,5-diidroxitolueno
Os	ósmio
P	fósforo
ρ	densidade
Pa	protactínio
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAR	radiação fotossinteticamente ativa



SÍMBOLOS DE UNIDADES

A	ampère
Å	ångström
atm	atmosfera
Bq	becquerel
Btu	<i>British thermal unit</i> (unidade térmica britânica)
bu	<i>bushel</i> (alqueire)
°C	grau Celsius ou centígrado
cal	caloria
Ci	curie
cm	centímetro
cmol	centimol
dm	decímetro
dpi	<i>dots per inch</i> (pontos por polegada)
°F	grau Fahrenheit
fl.oz.	<i>fluid ounce</i> (onça líquida)
ft	<i>foot, feet</i> (pé)
ft-c	<i>foot-candle</i> (vela-pé)
G	gauss
g	grama
gal	galão
Gy	gray (dose absorvida)
h	hora
ha	hectare
in	<i>inch</i> (polegada)
J	joule
K	grau Kelvin
Kb	quilobyte
kcal	quilocaloria
kg	quilograma
kHz	quilohertz
km	quilômetro
L	litro
lb	libra
m	metro
μ	mícron
mA	miliampère
meq	miliequivalente
Mg	megagrama
mg	miligramma
μg	micrograma
mho	recíproco de ohm, para condutância
mi	milha
min	minuto
mL	mililitro
μL	microlitro
mm	milímetro
μm	micrômetro
mmol	milimol

mOs	miliosmol
MPa	megapascal
mph	milhas por hora
ms	mili-segundo
mV	milivolt
μ V	microvolt
N	newton
nm	nanômetro
oz	<i>ounce</i> (onça)
pA	picoampère
pCi	picocurie
pg	picograma
ppm	partes por milhão
%	percentagem
psi	<i>pounds per square inch</i> (libras por polegada quadrada)
pt	pint
q	quintal (métrico)
qt	quarto
rad	radiano
rd	rad
rem	roentgen equivalente homem
rpm	rotações por minuto
rps	rotações por segundo
S	svedberg (para o coeficiente de sedimentação)
S	siemen
s	segundo
Sv	sievert
t	tonelada (métrica)
tbsp	<i>tablespoon</i> (colher de sopa)
Ton	tonelada (2.000 lb)
tsp	<i>teaspoon</i> (colher de chá)
UA	unidade de atividade
V	volt
W	watt
yd	<i>yard</i> (jarda)

1. INTRODUÇÃO

Na pesquisa biológica, a realidade mostra que, com raras exceções, a verdadeira iniciação em métodos laboratoriais só acontece após a graduação, com o envolvimento em projetos de tese ou programas de aperfeiçoamento. Da mesma forma, é grande a dificuldade de profissionais de áreas aplicadas em interagir com ações de pesquisa básica, mesmo quando atuam em campos de grande interface. Nesses casos, há uma tendência de se gastar parte substancial do tempo no aprendizado por tentativa e erro.

Poucas são as publicações, na área de fisiologia vegetal, que tratam da descrição conjunta de métodos analíticos e laboratoriais. Além disso, uma parte significativa se restringe a roteiros de aulas práticas, nos quais as técnicas são enfocadas de forma resumida e, não raro, dependem de explicações complementares do instrutor para execução. Apesar da importância desses documentos, os avanços brasileiros na pesquisa agropecuária, acoplados ao progresso nos campos da eletrônica e informática, têm gerado novas demandas científicas, onde o enfoque básico se destaca. Isso tem se refletido na procura por fontes descritivas de métodos, os quais por serem muito especializadas e, predominantemente, redigidas em inglês, dificultam o acesso do iniciante ao uso eficaz da tecnologia de seu interesse.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar descrições, passo a passo, de técnicas propostas para o estudo de forrageiras no laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa/CNPGL, visando facilitar a iniciação de profissionais nessa área do conhecimento. Para simplificar o texto, noções básicas, de amplo domínio, não foram abordadas, ficando a critério do leitor eventuais verificações na literatura¹.

Como rotina, o iniciante deve sempre lembrar que todo método científico possui fontes de erro, necessitando do máximo critério para execução. Em decorrência, o registro detalhado de procedimentos é fundamental, assim como a escolha adequada das unidades para expressar os resultados. Embora os métodos e aparelhos descritos neste trabalho utilizem sistemas de unidades variados, o SI (*Système Internationale*), dada sua adoção pela maioria dos periódicos científicos, deve ser empregado na apresentação final dos dados (Salisbury, 1991). Visando facilitar seu uso, uma tabela de fatores para conversão de unidades é apresentada no Apêndice A.

Deve-se ter em mente que este trabalho é uma abordagem prática e não representa uma revisão exaustiva de métodos. Nos capítulos iniciais, por exemplo, são apresentadas descrições condensadas de técnicas rotineiras, fundamentais para estudos fisiológicos, que se encontram descritas com maior detalhamento em outras obras. Vale lembrar, também, que as propostas apresentadas em cada tema de estudo selecionado são passíveis de alteração ou substituição pelo usuário, conforme as particularidades de seu trabalho. Na eventualidade do texto omitir técnicas ou informações que o leitor considere necessárias, fontes especializadas deverão ser consultadas. Tratados abrangentes sobre assuntos essenciais estão disponíveis na literatura, tais como métodos fitoquímicos (Harborne, 1973) e teoria e funcionamento de instrumentação para análise (Marshall & Woodward 1985, Skoog 1985, Pearcey et al. 1989 e Shoeff & Williams 1993). As técnicas para estudos anatômicos e citoquímicos - não abordadas neste trabalho - estão descritas em tratados sobre microtécnicas (Berlyn & Miksche, 1976), microscopia (Lacey, 1989), microscopia eletrônica (Bozzola & Russell, 1992) e processamento digital de imagens (Shotton, 1993). Da mesma forma, métodos utilizando radioisótopos foram evitados, devendo o leitor se referir a Chase & Rabinowitz (1970) ou Slater (1990). Para auxiliar o leitor na verificação de outros temas, uma listagem de fontes de consulta para tópicos metodológicos complementares é apresentada no Apêndice B.

¹NOTA: De um modo geral, a menção de marcas, modelos e fornecedores de equipamentos, reagentes e suprimentos foi evitada, devendo o interessado procurá-los nas fontes citadas, ou junto às firmas comerciais do ramo. Algumas marcas registradas são mencionadas, devido ao seu uso consagrado na literatura. Todavia, isso não implica em endosso, em comparação a outros produtos similares.

Por último, pesquisadores não devem se deixar inibir por limitações materiais. Muitas vezes, é possível adaptar determinado método de análise à infra-estrutura disponível. Nesse particular, o trabalho em equipe dentro de um laboratório e a interação entre laboratórios dentro de uma instituição desempenham papel primordial.

1.1. Referências Bibliográficas

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: The Iowa State University Press, 1976. 326 p.

BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electronic microscopy: principles and techniques for biologists**. Boston: Jones and Bartlett, 1992. 542 p.

CHASE, G.D.; RABINOWITZ, J.L. **Principles of radioisotope methodology**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1970. 3.ed. 633 p.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods**. London: Chapman and Hall, 1973. 278 p.

LACEY, A.J. **Light microscopy in biology: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1989. 329 p.

MARSHALL, B.; WOODWARD, F.I. **Instrumentation for environmental physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 241 p.

PEARCEY, R.W.; EHLERINGER, J.R.; MOONEY, H.A. **Plant physiological ecology: field methods and instrumentation**. London: Chapman & Hall, 1989. 457 p.

SALISBURY, F.B. Systeme Internationale: The use of SI units in plant physiology. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.139, p.1-7, 1991.

SCHOEFF, L.E.; WILLIAMS, R.H. **Principles of laboratory instruments**. St. Louis: Mosby Year-Book Inc., 1993. 473 p.

SHOTTON, D. **Electronic light microscopy: techniques in modern biomedical microscopy**. New York: Wiley-Liss, 1993. 355 p.

SKOOG, D.A. **Principles of instrumental analysis**. 3.ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1985. 879 p.

SLATER, R.J. **Radioisotopes in biology: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990. 307 p.

2. NORMAS GERAIS PARA O LABORATÓRIO

2.1. Introdução

Normas de segurança e de gerenciamento devem ser afixadas próximo à entrada do laboratório. Elas têm de ser do domínio do grupo de trabalho e são o primeiro ensinamento a ser ministrado aos novatos. A segurança individual e coletiva vai além da mera prevenção de acidentes - substâncias tóxicas, de efeito cumulativo, estarão sendo manuseadas com certa frequência, requerendo a devida precaução. A observância das normas é crucial para a organização e eficiente condução dos trabalhos.

Cada laboratório possui particularidades que geram diferentes demandas normativas. As presentes regras, propostas para o laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa/CNPGL, talvez se apliquem à maioria dos casos. Evidentemente, estudos envolvendo radioisótopos e organismos patogênicos ou transgênicos requerem normas adicionais, de contenção e biossegurança.

2.2. Normas de Segurança

2.2.1. Regras Gerais

- A. Habitue-se com a localização dos extintores de incêndio, mangueiras de água, alarmes, chuveiros de segurança, lavatórios para olhos, estojo de primeiros socorros, listagem dos números telefônicos para emergência e saídas do prédio mais próximas.
- B. Evite obstruir os corredores entre bancadas com utensílios, tais como cadeiras ou caixas. Esses locais são áreas de circulação de pessoal e devem ficar desimpedidos.
- C. Não coloque alimentos nos refrigeradores ou nas estufas do laboratório.
- D. Não prepare alimentos no forno de microondas do laboratório.
- E. Não fume, não beba e não faça refeições dentro do laboratório.
- F. Abra a autoclave devagar, posicionando-se lateralmente com relação à porta, para evitar queimaduras pelo vapor residual. Lembre-se de usar luvas apropriadas para remover seu material.
- G. Evite entornar substâncias que deixem o piso escorregadio (ex. cera ou parafina derretida). Ao trabalhar com esse tipo de material, forre o piso em sua área de ação.
- H. Arranje seu ensaio de forma prática, para que possa alcançar torneiras, tomadas e interruptores pelo lado de fora de sua montagem experimental.
- I. Evite molhar o piso. Caso isso ocorra, coloque um aviso de alerta, de fácil visualização, até que o problema seja sanado.
- J. Tenha muito cuidado ao manipular substâncias inflamáveis. Caso suas roupas peguem fogo, IMEDIATAMENTE deite-se e role no chão, para abafar as chamas. Se perceber que as roupas de um colega estão em chamas, jogue o colega no chão e role-o, para abafá-las. Muito frequentemente, a pessoa tende a entrar

em pânico, nessas situações, e correr, resultando em queimaduras dolorosas e, às vezes, graves.

- K. Manipule o nitrogênio líquido em garrafa apropriada, usando luvas adequadas.
- L. Use luvas ao fazer reparos com a cola de silicone. Ela é uma neurotoxina de penetração cutânea e somente poderá ser tocada com mãos livres, após a polimerização.
- M. Tome os seguintes cuidados, quando for o último a deixar o laboratório: verifique se os registros de gases estão fechados, desligue aparelhos que não estejam em uso, tranque janelas e portas e apague as luzes.
- N. Consulte a literatura especializada (Furr, 1989 e Luxon, 1992), em caso de dúvidas mais específicas sobre segurança.

2.2.2. Manipulação de Reagentes

- A. Mantenha reagentes incompatíveis nas respectivas áreas, para prevenir situações de risco.
- B. Segure o frasco pelo lado onde está localizado o rótulo.
- C. Não pipete com a boca. Use acessório apropriado.
- D. Faça a diluição de ácidos tendo a precaução de derramar o ácido na água e não vice-versa.
- E. Não aqueça líquidos inflamáveis em chapa elétrica; use manta de aquecimento ou banho de vapor.
- F. Manipule substâncias voláteis SOMENTE na capela para exaustão de gases, para prevenir a inalação de toxinas.
- G. Use luvas e óculos de segurança para manipular substâncias tóxicas. Use máscara respiratória para voláteis, mesmo operando na capela.
- H. Não coloque o ácido perclórico ou seus gases em contato com madeira ou outros materiais orgânicos.
- I. Consulte a literatura especializada (Lide, 1993), em caso de dúvidas mais específicas.

2.2.3. Derramamentos e Vazamentos

- A. Tome as seguintes providências, quando houver derramamentos ou vazamentos de substâncias inflamáveis, tóxicas ou corrosivas:
 - a) Desligue o fornecimento de energia elétrica à área ou ao equipamento, para eliminar riscos de ignição.
 - b) Aumente a ventilação, abrindo portas e janelas.
 - c) Chame o pessoal de segurança e manutenção.

2.2.4. Vidraria

- A. Lubrifique frascos ou tubulações com glicerol ou água, quando for vedá-los com rolhas de vidro ou de borracha.
- B. Use somente ferramentas apropriadas para cortar tubulação de vidro. Lembre-se de colocar luvas e proteção facial.
- C. Monte sistemas de vácuo somente com frascos de parede espessa. Passe fita adesiva na superfície do frasco, em cruzeta, para prevenir projeção de fragmentos, em caso de implosão.
- D. Colete vidros quebrados com vassoura e pá. Recolha pequenos fragmentos com algodão molhado, usando uma pinça.

2.2.5. Manejo do Lixo

- A. Acondicione o lixo químico em recipiente próprio, devidamente identificado. Lembre-se que várias substâncias não podem ser despejadas nas pias, tais como fenol-clorofórmio, tris-borato e metanol-ácido acético.
- B. Acondicione dejetos sólidos (poliacrilamida e plásticos contaminados com fenol-clorofórmio) no recipiente específico.
- C. Descarte fragmentos de vidro no recipiente específico.
- D. Deposite agulhas e lâminas usadas na caixa específica, localizada em uma das bancadas. NUNCA as descarte nas cestas de lixo.

2.3. Normas de Gerenciamento

2.3.1. Atribuições Individuais

- A. Limpe sua bancada individual de trabalho ao final do expediente, devolvendo os materiais utilizados aos locais apropriados.
- B. Limpe as áreas de trabalho coletivo que tiver utilizado (bancada de eletroforese, câmaras de crescimento, sala de moagem, capelas, autoclave, centrífugas, espectrofotômetros, etc.).
- C. Recolha seu lixo, descartando-o nos recipientes adequados.
- D. Não armazene materiais dentro das capelas de fluxo laminar, porque elas têm de estar livres para o trabalho.
- E. Procure familiarizar-se com o procedimento, antes de conduzir uma análise. Sempre que necessário, consulte um dicionário de termos técnicos (Morris, 1992).
- F. Planeje seu experimento com antecedência, verificando a disponibilidade de equipamentos, reagentes, suprimentos e vidraria com o líder do laboratório.
- G. Faça os acertos com a devida antecedência, junto ao líder do laboratório, caso necessite de pessoal de apoio (laboratorista ou estagiários).
- H. Tente trabalhar com calma, pois evitará acidentes e erros experimentais.
- I. Não hesite em passar algumas horas calibrando instrumentos (psicrômetros, porômetro, etc.), em caso de incerteza. Você gastará muito menos tempo do que se tiver que repetir o ensaio todo.

2.3.2. Livro de Anotações

- A. Use um caderno de capa dura e páginas numeradas como seu Livro de Anotações pessoais.
- B. Identifique o livro com seu nome, o laboratório onde você trabalha, data e número do volume.
- C. Faça as anotações a lápis. Use o lado direito da página para anotações formais e o esquerdo para rascunho e cálculos.
- D. Use as três primeiras folhas como Sumário.
- E. Registre todas as suas atividades, detalhe os procedimentos (inclusive, a idade e o estado geral dos espécimens) e inclua hora e data. Assim, o método poderá ser reproduzido no futuro.

- F. Identifique e cole prontamente, no Livro de Anotações, quaisquer folhas avulsas que sejam importantes.
- G. Habitue-se a escrever com clareza, seqüência e boa caligrafia, para que não existam dúvidas, quando o texto for lido no futuro. A estrutura do relato científico se inicia nas primeiras notas tomadas no laboratório (vide Ebel et al., 1987).
- H. Mantenha seu Livro de Anotações a uma distância segura de suas análises. Não permita que derramamentos acidentais apaguem informações preciosas. Se você usa computador, armazene seus dados e informações estratégicos em disquete.

2.3.3. Preparo de Reagentes

- A. Tome a seguinte precaução, ao preparar um reagente: rotule o frasco **IMEDIATAMENTE**, colocando o nome do reagente, a concentração, a data, as iniciais de seu nome e a identificação do laboratório. Em alguns casos (ex. manipulações envolvendo material genômico), é necessário anotar também a origem, grau de pureza e PM dos compostos utilizados.
- B. Mantenha os estoques de reagentes em estado virgem, na medida do possível. Exceto quando o reagente for muito caro, evite inserir colheres, medidas, espátulas, bastões ou pipetas diretamente nos estoques. Habitue-se a colocar uma quantidade suficiente do reagente em um recipiente adequado, para então fazer as manipulações.
- C. Não confie em uma solução que você mesmo não tenha preparado, exceto aquelas de uso comunitário. Nunca teste um reagente pelo odor ou sabor. Praticamente, todos os compostos químicos, em maior ou menor grau, são venenosos.
- D. Não confie em vidraria que você mesmo não tenha lavado.
- E. Limpe pequenos derramamentos imediatamente, desde que não haja riscos à sua integridade física.
- F. Prepare novo estoque, ao verificar que um reagente de uso comunitário está acabando. Caso sinta que esteja preparando reagentes comunitários mais do que deveria, fale com o líder do laboratório.
- G. Enfatize, no respectivo rótulo, a vida útil de reagentes instáveis, de curta validade.
- H. Verifique se o reagente requer condições especiais de estocagem (ex. vidro âmbar, baixa temperatura, dessecador, etc.), antes de fazer a preparação.
- I. Identifique adequadamente os reagentes contendo substâncias prejudiciais ou perigosas (ex. veneno, inflamável, neurotoxina, etc.).
- J. Acondicione reagentes somente em recipientes com vedação.
- K. Devolva sempre o estoque do reagente ao seu local de origem.

2.3.4. Equipamentos

- A. Reserve com antecedência (no mínimo, de uma semana) a utilização de aparelhos de uso freqüente (autoclave, banho-maria, capela de fluxo laminar, centrífuga, computador e liofilizador). Cada um, deles possui uma cartela mensal, para o

usuário especificar os períodos em que irá utilizá-lo.

- B. Leia o manual ou cartela plastificada de instruções antes de operar um aparelho e verifique a voltagem antes de conectar a tomada.
- C. Comunique ao líder do laboratório, IMEDIATAMENTE, qualquer defeito em aparelhagem.
- D. Não opere aparelhos equipados com microprocessador (isso inclui o computador) em dias de chuvas fortes ou tempestades.
- E. Calibre o medidor de pH, sempre que for o primeiro usuário do dia.
- F. Mantenha o eletrodo do medidor de pH imerso na solução de KCl saturado.
- G. Verifique se há carga suficiente na bateria dos aparelhos portáteis (medidor de área foliar, porômetro, etc.), antes de operá-los.
- H. Não deixe faltar água nas bandejas das câmaras de crescimento, para não comprometer a U.R. de seu ensaio.

2.3.5. Computador

- A. Use somente programas licenciados. Caso precise usar *shareware*, certifique-se de que ele está livre de vírus.
- B. Fale antes com o líder do laboratório, caso necessite alterar a configuração do sistema.
- C. Não armazene seus arquivos no disco rígido. O espaço livre é reservado para uso exclusivo do laboratório.
- D. Faça *backups* de seus arquivos.

2.3.6. Centrífugas

- A. Opere uma centrífuga somente após haver sido treinado pelo líder do laboratório ou pessoa designada.
- B. Mantenha um registro detalhado do uso de centrífugas de alta velocidade e de seus rotores.
- C. JAMAIS exceda a velocidade máxima (rpm) recomendada para um rotor.
- D. Inspeccione detalhadamente o estado físico dos tubos de centrifugação antes de conduzir uma ultracentrifugação.
- E. Pare a centrífuga IMEDIATAMENTE, em caso de ruído ou vibração anormal.
- F. Mantenha a tampa fechada durante toda a operação.
- G. Tome as seguintes precauções com os tubos de nitrocelulose (não autoclaváveis): conserve-os a 4°C, não os use se estiverem flexíveis ou perdendo coloração e use-os somente em rotores tipo *swinging bucket*.
- H. Faça o balanceamento individual de pares opostos de tubos, por pesagem, a mais precisa possível.

2.3.7. Materiais de Outros Laboratórios

- A. **SEMPRE** peça permissão ao líder de outro laboratório antes de usar as dependências ou retirar qualquer material. Sempre devolva limpos e em condições normais de uso os materiais que tomar emprestado.

2.3.8. Curva Padrão

- A. Não use a mesma curva padrão dia após dia - é uma fonte de erro.
- B. Pipete com a maior precisão possível, no preparo de soluções para a curva padrão. Uma única gota já é fonte de considerável erro.
- C. Obtenha a regressão em calculadora, em vez de desenhar a curva padrão, quando estiver usando a porção linear para obter estimativas. O erro mecânico que se comete ao desenhar o gráfico será evitado.

2.4. Referências
Bibliográficas

- EBEL, H.F.; BLIEFERT, C.; RUSSEY, W.E. **The art of scientific writing**. New York: VCH Publishers, 1987. 493 p.
- FURR, A.K. **CRC handbook of laboratory safety**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 704 p.
- LIDE, D.R. **Basic laboratory and industrial chemicals: a CRC quick reference handbook**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 370 p.
- LUXON, S.G. **Hazards in the chemical laboratory**. 5.ed. London: Royal Society of Chemistry, 1992. 700 p.
- MORRIS, C. **Academic Press dictionary of science and technology**. San Diego: Academic Press, 1992. 2.432 p.

3. SOLUÇÕES E CONCENTRAÇÕES

CUIDADOS

- Efetue pesagens e pipetagens com a maior precisão possível.
- Lembre-se de que, ao pipetar líquidos incolores, o volume correto corresponde ao ponto em que o menisco, situado no topo do líquido pipetado, coincide com a marca na graduação do volume desejado. Para líquidos coloridos, onde o fundo do menisco não é visível, as bordas do menisco devem coincidir com a graduação desejada.
- Lembre-se de que, no preparo de soluções, a concentração desejada é obtida com o soluto já fazendo parte do volume final (ou seja, é errado adicionar a quantidade de soluto ao solvente com este último já no volume final desejado para a solução).
- Tome o cuidado de transformar os resultados para a unidade adequada, nos cálculos de diluição.
- Use a forma decimal nos cálculos envolvendo percentagem.
- Tome cuidado com a diluição! Ex. diluir uma solução de RNA quatro vezes significa que três volumes do solvente utilizado serão adicionados a um volume da solução original.

3.1. Introdução

Muitos métodos analíticos envolvem reações que ocorrem em soluções aquosas. Por isso, é conveniente revisar as maneiras de se expressar e interconverter concentrações de soluções, conforme descrito por Segel (1976). Alguns exercícios são também apresentados, enfocando situações rotineiras em laboratório.

3.2. Concentrações com Base no Volume

Molaridade (M) = número de moles do soluto por litro de solução

Para se calcular M, é preciso conhecer o peso do soluto dissolvido e seu peso molecular (PM, normalmente disponível no rótulo da embalagem ou no catálogo do fornecedor).

$$\text{moles} = \text{peso (g)} / \text{PM}$$

E lembre-se que:

$$1 \text{ mM} = 10^{-3} \text{ M} = 1 \text{ mmole.L}^{-1} = 1 \text{ }\mu\text{mole.mL}^{-1}$$

$$1 \text{ }\mu\text{M} = 10^{-6} \text{ M} = 1 \text{ }\mu\text{mole.L}^{-1} = 1 \text{ nmole.mL}^{-1}$$

$$1 \text{ nM} = 10^{-9} \text{ M} = 1 \text{ nmole.L}^{-1} = 1 \text{ pmole.mL}^{-1}$$

Uma solução 1 M contém 1 número de Avogadro de moléculas.L⁻¹.

$$\begin{aligned} \text{Número de Avogadro} &= \text{número de moléculas por g-mole} \\ &= \text{número de átomos por g-átomo} \end{aligned}$$

$$= \text{número de íons por g-íon}$$

$$= 6,023 \cdot 10^{23}$$

Normalidade (N) = número de equivalentes-grama de soluto por litro de solução

Para se calcular N, é preciso conhecer o peso do soluto dissolvido e seu peso equivalente (PE).

$$\text{equivalentes} = \text{peso (g)} / \text{PE}$$

Um equivalente de um ácido ou base é o peso que contém 1 g-átomo (1 mole) de hidrogênio substituível ou 1 g-íon (1 mole) de hidroxila substituível. Em geral, aceita-se que:

$$\text{PE} = \text{PM}/n$$

em que "n" é o número de H⁺ ou OH⁻ substituíveis por molécula (respectivamente, de um ácido ou de uma base). Temos também que:

$$N = nM$$

Por exemplo, uma solução H₂SO₄ 0,01 M é também 0,02 N.

Outras expressões incluem:

- % p/v (percentagem peso/volume) = peso (g) de um soluto por 100 mL de solução
- % mg (percentagem miligrama) = peso (g) de um soluto por 100 mL de solução
- Osmolaridade = molaridade de partículas em solução
- Uma solução 1 M de um soluto não dissociável é também 1 Osmolar (contém $6,023 \times 10^{23}$ partículas por litro).
- Uma solução 1 M de um sal dissociável é n Osmolar (n = número de íons por molécula), ou seja, uma solução KCl 0,03 M é 0,06 Osmolar.

A osmolaridade é relevante para estudos fisiológicos nos quais células ou tecidos têm de ser banhados em solução equivalente em osmolaridade ao citoplasma, para que não haja perda ou absorção de água pela célula ou tecido. Nesse caso, a solução usada é dita *isotônica* com relação às células ou tecido.

3.3. Concentrações com Base no Peso

% p/p (percentagem peso/peso) = peso (g) de um soluto por 100 g de solução

A concentração de vários ácidos comerciais é expressa em p/p. Para se calcular o volume de solução-estoque necessária para uma dada preparação, é necessário saber a densidade ou gravidade específica, conforme:

ρ = densidade = peso por unidade de volume

GE = gravidade específica = densidade com relação à água.

Já que a densidade da água é 1 g.mL^{-1} , a GE é numericamente igual a p .

ppm (partes por milhão): indica uma razão de concentração em soluções. É similar à percentagem, porque é também uma fração. Todavia, o denominador é sempre 1 milhão. É usada para expressar pequenas quantidades de soluto. O termo *partes* pode se referir a qualquer unidade, mas *g* é a mais utilizada.

Molalidade (m) = número de moles do soluto por 1.000 g de solvente

A molalidade é utilizada em cálculos físico-químicos (ex. ponto de ebulição). Para soluções aquosas dilutas, m e M serão muito próximas. Para a interconversão de m e M , é necessário saber a % (p/p).

3.4. Concentrações com Base no Grau de Saturação

Proteínas são freqüentemente purificadas por precipitação diferencial com sais neutros (ex. sulfato de amônio ou cloreto de sódio). Normalmente, a concentração dos sais utilizados é expressa em *percentagem de saturação*.

Percentagem de Saturação = concentração do sal em solução como percentagem da concentração máxima possível, a uma dada temperatura

Para calcular-se as mudanças de volume causadas pela adição de grandes quantidades de sal em solução aquosa, é necessário saber o *volume específico* (v) do sal, ou seja:

$$v = \text{volume ocupado por 1 g do sal (mL.g}^{-1}\text{)} = \text{inverso da densidade}$$

3.5. Exercícios

A. (a) Quantos gramas de NaOH sólido são necessários para preparar 600 mL de uma solução 0.05 M? Expresse a concentração também em: (b) N, (c) g.L^{-1} , (d) % p/v e (e) osmolaridade.

a) litros x M = número de moles de NaOH necessários

$$0,6 \times 0,05 = 0,03 \text{ mole de NaOH}$$

$$\text{número de moles} = \text{Peso}_g / \text{PM} = 0,03 = \text{Peso}_g / 40 = 1,2 \text{ g}$$

Pese 12 g, dissolva em um pouco de água e complete para 600 mL.

Alternativamente, faça os cálculos utilizando a regra de três:

$$40 \text{ (PM)} \rightarrow 1 \text{ M}$$

$$x \rightarrow 0,05 \text{ M}$$

$$x = 0,05 \times 40 / 1 = 2 \text{ g em 1 L, ou 1,2 g em 0,6 L.}$$

b) $M = N$, nesse caso. A solução é 0.05 N.

c) A solução contém 1.2 g/600 mL, ou $2,0 \text{ g.L}^{-1}$.

d) % (p/v) = g por 100 mL, ou seja, $2,0 \text{ g.L}^{-1} = 0,2 \text{ g.100 mL}^{-1} = 0,2\% \text{ (p/v)}$.

e) NaOH libera duas partículas (Na^+ e OH^-).

$$\text{Osmolaridade} = 2 \times M = 0,10 \text{ Osmolar}$$

B. Quantos mL de H_2SO_4 4 M são necessários para se preparar 1.500 mL de uma solução H_2SO_4 0,003 M ?

$$V' \cdot M' \text{ (solução diluída)} = V \cdot M \text{ (solução concentrada)}$$

$$1,5 \times 0,003 = V \times 4 \quad \dots \quad V = 1,5 \times 0,003/4 = 0,0011 \text{ L, ou } 1,1 \text{ mL.}$$

Dissolva 1,1 mL da solução concentrada em água e complete o volume para 1,5 L.

C. Descreva a preparação de 2 litros de HCl 0,4 M a partir de solução HCl 28% (p/p), densidade=1,15.

a) $V \times M =$ número de moles

$$2 \times 0,4 = 0,8 \text{ mole de HCl é necessário.}$$

b) $\text{Peso}_g =$ número de moles \times PM = $0,8 \times 36,5 = 29,2$ g HCl puro são necessários.

c) Mas, a solução-estoque é HCl 28 % (p/p)

$$\text{Quantidade necessária} = 29,2/0,28 = 104,3 \text{ g da solução-estoque.}$$

d) Em vez de pesar 104,3 g da solução-estoque, pode-se calcular o volume necessário, conforme abaixo:

$$V_{\text{ml}} = \text{Peso}_g / \rho_{g/\text{ml}} = 104,3/1,15 = 90,7 \text{ mL}$$

Meça 90,7 mL da solução-estoque e faça a diluição para 2 L com água.

e) c e d podem ser combinados em uma única equação, a saber:

$$\text{Peso}_g = V_{\text{ml}} \times \rho_{g/\text{ml}} \times \% \text{ (na forma decimal), de onde:}$$

$$V_{\text{ml}} = \text{Peso}_g / \rho \times \% = 29,2/1,15 \times 0,28 = 90,7 \text{ mL.}$$

D. O v do sulfato de amônio (SA) sólido é $0,565 \text{ mg.g}^{-1}$ (Segel, 1976). A solubilidade do SA a 0°C é $706 \text{ g}/1.000 \text{ g}$ de água (NOTA: este valor varia, de acordo com a fonte e com a temperatura - o catálogo SIGMA 1995, por exemplo, cita a solubilidade do SA como 1 M em água, a 20°C , o que corresponde a $132,1 \text{ g}/1.000 \text{ g}$ de água). Calcule a concentração de SA em solução saturada a 0°C .

A 0°C , são 706 g de sulfato de amônio em 1.000 g de água, e o volume ocupado é:

$$1.000 \text{ mL} + (706)(0,565) \text{ mL} = 1.399 \text{ mL.}$$

$$\text{A concentração de SA será} = 706/1.399 = 0,505 \text{ g.mL}^{-1} = 505 \text{ g.L}^{-1}$$

$$\text{O PM do SA é } 132,1 \text{ e a molaridade da solução é} = 505/132,1 = 3,82 \text{ M.}$$

E. Descreva o preparo de uma solução aquosa de etanol nas seguintes concentrações: (a) 13% (p/p), (b) 13% (p/v) e (c) 13% (v/v).

a) 13 g de etanol + 87 g de água destilada.

b) $\rho = M/V$; $0,79 = 13/V$; $V = 13/0,79 = 16,5 \text{ mL}$

Portanto, 13 g de etanol equivalem a 16,5 mL.

$100 - 16,5 = 83,5 \text{ mL}$ de água. Logo:

13 g etanol + 87 mL água destilada.

c) 13 mL etanol + 87 mL água destilada.

F. Como você prepararia essa solução sem utilizar uma balança?

A resposta é obtida com o mesmo raciocínio usado no item (b) do problema anterior: se 13 g de etanol equivalem a 16,5 mL, seriam 16,5 mL de etanol + 83,5 mL de água destilada.

G. Como preparar 1 litro de etanol 23% (v/v) a partir de etanol 95% (v/v) ?

$C \cdot V = C' \cdot V'$, em que C = concentração e V = volume

$95 \cdot x = 23 \cdot 1.000$ $x = 23.000/95 = 242,1 \text{ mL}$

Adicione 242,1 mL de etanol 95% a 757,9 mL de água destilada.

Outra maneira de resolver a questão é utilizando-se a regra de três, sabendo que etanol 23% representa 230 mL de etanol puro em 1.000 mL de solução, portanto:

1.000 mL \rightarrow 950 mL

$x \rightarrow 230 \text{ mL}$ $x = 230 \cdot 1.000/950 = 242,1 \text{ mL}$

II. Como expressar uma solução Na_2SO_4 50 ppm em termos de (a) % (p/v) e (b) mM?

(a) $50 \text{ ppm} = 50 \text{ g}/1.000.000 \text{ g}$ de água. Visto que $1.000 \text{ g} = 1 \text{ L}$ de água,
 $= 50 \text{ g}/1.000 \text{ L}$
 $= 5\% \text{ (p/v)}$

(b) O PM do Na_2SO_4 é 142. Temos 50 g dissolvidos em 1 L

1 M \rightarrow 142

$x \rightarrow 50$ $x = 50/142 = 0,352 \text{ M} = 352 \text{ mM}$

I. Como preparar 300 mL de uma solução NaCl 0,3 M?

$M = n^\circ \text{ de moles} \cdot \text{L}^{-1}$ PM NaCl $\cong 58$

$0,3 \text{ M} = \frac{\text{g NaCl}}{\text{L}} \times 1 \text{ mole NaCl}/0,3 \text{ L} \times 58 \text{ g NaCl} = \frac{\text{g NaCl}}{\text{L}}/17,4$

$\frac{\text{g NaCl}}{\text{L}} = 17,4 \times 0,3 = 5,22 \text{ g}$ de NaCl dissolvidos em 300 mL de água destilada.

J. Como preparar 300 mL de NaCl 0,6 M a partir de uma solução-estoque NaCl 0,7 M?

$$C.V = C'. V'$$

$$0,7.V = 0,6.300 \quad V = 257,1$$

Complete 257,1 mL de solução NaCl 0,7 M com água até os 300 mL.

L. Prepare as seguintes soluções, para extração de DNA genômico: (a) 300 mL de HCl 0,25 M, a partir de estoque HCl 5 N, (b) 500 mL de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, a partir dos estoques NaOH 10 N e NaCl 5 M, e (c) 1.000 mL de NH_4OAc 1 M, NaOH 20 mM, a partir dos estoques NH_4OAc 5 M e NaOH 10 N. (NOTA: lembre-se de sempre converter todos os casos para a mesma unidade).

a) O estoque é 5 N = 5 M

$$5 \text{ M} \rightarrow 100 \text{ mL}$$

$$0,25 \text{ M} \rightarrow x \quad x = 0,25.100/5 = 5 \text{ mL do estoque para preparar 100 mL da solução.}$$

$$5 \times 3 = 15 \text{ mL do estoque, completando com água até 300 mL.}$$

b) NaOH: o estoque é 10 N = 10 M

$$10 \text{ M} \rightarrow 100 \text{ mL}$$

$$0,5 \text{ M} \rightarrow x \quad x = 0,5.100/10 = 5 \text{ mL do estoque para preparar 100 mL da solução.}$$

$$5 \times 5 = 25 \text{ mL do estoque para preparar 500 mL da solução.}$$

NaCl: o estoque é 5 M.

$$5 \text{ M} \rightarrow 100$$

$$1,5 \text{ M} \rightarrow x \quad x = 1,5.100/5 = 30 \text{ mL do estoque para preparar 100 mL da solução.}$$

$$30 \times 5 = 150 \text{ mL do estoque para preparar 500 mL da solução.}$$

Adicione 25 mL de NaOH 10 M a 150 mL de NaCl 5M e complete o volume para 500 mL.

c) NH_4OAc : o estoque é 5 M.

$$5 \text{ M} \rightarrow 1.000$$

$$1 \text{ M} \rightarrow x \quad x = 1.000/5 = 200 \text{ mL}$$

NaOH: o estoque é 10 N = 10 M = 10.000 mM

$$10.000 \text{ mM} \rightarrow 1.000$$

$$20 \text{ mM} \rightarrow x \quad x = 20.1.000/10.000 = 2 \text{ mL}$$

Adicione 2 mL de NaOH 10 N a 200 mL de NH_4OAc 5 M e complete com água até 1.000 mL.

3.6. Referência Bibliográfica

SEGEL, I.H. *Biochemical calculations*. 2.ed. New York: Wiley, 1976. 441 p.

4. CENTRIFUGAÇÃO

CUIDADOS

- Não instale a centrífuga em área sujeita à incidência de raios solares.
- Certifique-se, para as centrífugas de mesa, de que a base de suporte é resistente e está nivelada.
- Não inicie a centrifugação sem antes colocar a tampa no rotor e travá-la convenientemente.
- Faça o balanceamento de pares opostos de tubos, individualmente - sempre pelo peso, nunca pelo volume. Se o rotor contiver massas desiguais em compartimentos opostos, excedendo a margem especificada pelo fabricante, o eixo será danificado. Tubos contendo água podem ser utilizados para balancear o rotor.
- Reinicie o ciclo, em caso de falta de energia elétrica durante uma corrida.
- Consulte os manuais do fabricante, para a escolha adequada do tipo de rotor.
- Verifique, no manual do fabricante, os cuidados necessários na manipulação dos rotores, como e onde guardá-los e as informações sobre a vida útil deles.

4.1. Introdução

A força centrífuga é um recurso básico na pesquisa em fisiologia vegetal, para separar componentes de densidades variadas. A centrífuga separa precipitados químicos de soluções e resíduos celulares de extratos. Neste capítulo é apresentada uma descrição geral do uso de uma centrífuga refrigerada programável. Outras informações poderão ser obtidas, consultando-se Rickwood (1992) e Rickwood et al. (1994).

4.2. Fundamento

A força centrífuga exercida em uma partícula é dada pela relação:

$$F = m.a = m.\omega^2.r = w/g.\omega^2.r$$

Em que:

F = força exercida sobre a partícula, em dinas

m = massa da partícula, em gramas

ω = velocidade angular de rotação, em radianos.s^{-1}

r = distância radial da partícula ao eixo de rotação, ou raio do rotor, em cm

w = peso da partícula

g = constante gravitacional (980 cm.s^{-2})

Para efeitos de comparação e reprodução de condições experimentais, o termo *força centrífuga relativa* (RCF) é utilizado, representando a força que age sobre uma dada partícula em um campo centrífugo, em termos de múltiplos do peso da partícula (g) no campo gravitacional terrestre. Portanto:

$$\text{RCF} = \frac{w^2 \cdot r}{g}$$

Para converter w em rotações por segundo, temos:

$w = \text{rpm} \times 2\pi/60$, em que: $\pi = 3.1416$ e rpm = rotações por minuto.

Visto que: $g = 980 \text{ cm.s}^{-2}$, temos:

$$\text{RCF} = (\text{rpm} \cdot 2\pi/60)^2 \cdot r/980$$

$$\text{RCF} = (2\pi/60)^2 \cdot 1/980 \cdot r \cdot \text{rpm}^2, \text{ ou seja:}$$

$$\text{RCF} = 1.118 \cdot r \cdot \text{rpm}^2 \cdot 10^{-18}$$

Outras relações, para uso do raio do rotor expresso fora do sistema métrico, podem ser utilizadas, tais como:

$$\text{RCF} = \frac{4 \cdot (3.1416)^2 \cdot r \cdot n^2}{32.2} \cdot g$$

em que r = raio do rotor, em pés, e n = rotações por segundo = rpm/60; e:

$$\text{RCF} = 28.38 \cdot r \cdot \left(\frac{n}{1.000} \right)^2$$

em que r = raio do rotor, em polegadas, e n = rotações por minuto.

4.3. Notas sobre a Definição de Parâmetros

- A. Selecione a temperatura desejada na câmara do rotor. Em muitos casos, o sistema de refrigeração, durante a pausa para esfriamento, seleciona automaticamente o ciclo de tarefa adequado para manutenção da temperatura escolhida. Por isso, a duração da corrida não precisa estar selecionada. Monitore o indicador da temperatura do ar dentro da câmara do rotor. O indicador de refrigeração permanecerá aceso, enquanto o compressor estiver atuando.
- B. Selecione a velocidade (angular) desejada no rotor. Use uma das equações do item 4.2., para obter a força centrífuga desejada, expressa em $x g$. Procure fazer uma tabela, contendo as relações entre rpm e $x g$, para o raio de cada rotor disponível. Em alguns modelos recentes, isto não é necessário - a centrífuga possui mecanismo de identificação do rotor que está acoplado, permitindo ao operador digitar a RCF desejada diretamente no painel.
- C. Selecione a duração da corrida. Em alguns modelos, esta pode ser alterada com a máquina em funcionamento. Quando o módulo de operação contínua é selecionado, a centrifugação ocorrerá indefinidamente, até ser paralisada pelo operador.
- D. Abra a centrífuga somente quando o indicador de frenagem estiver ativado. Certifique-se de que a velocidade do rotor está abaixo de 100 rpm. Em alguns modelos, a tampa é automaticamente destravada, após a frenagem. Várias centrífugas possuem módulo para programação do tempo de frenagem, o qual varia conforme o rotor utilizado.

4.4. Encaixe do Rotor

- A. Verifique o tipo de encaixe do rotor. Existem rotores que são presos por um único parafuso, com rosca para a esquerda, ao cone com rosca sem fim do rotor. Outros são presos por dois parafusos com rosca para a esquerda (trava dupla) situados na tampa do rotor. O parafuso com rosca maior prende a tampa ao rotor e o menor prende o rotor ao cone com rosca sem fim. Aperte cada parafuso separadamente - primeiro o maior e depois o menor.
- B. Antes de encaixar o rotor no cone com rosca sem fim do eixo do rotor, certifique-se de que a rosca e o orifício central do rotor estão limpos e livres de arranhões ou entalhes. Passe papel absorvente nas superfícies, cada vez que for fazer um encaixe, para minimizar a ocorrência de arranhões, aderência ou corrosão do rotor. Encaixe o rotor no cone com rosca sem fim.
- C. Se a temperatura da câmara da centrífuga estiver abaixo da temperatura ambiente e o rotor não tiver sido pré-esfriado, espere até que a temperatura do rotor se equilibre com a temperatura mais baixa da câmara, antes de fazer o encaixe final do rotor. Este cuidado minimizará as chances do rotor ficar agarrado ao cone com rosca sem fim.

4.5. Operação Típica em Módulo Normal

- A. Antes de ligar a centrífuga, faça o balanceamento dos tubos com amostras e encaixe-os nos orifícios do rotor.
- B. Com o eixo parado, instale o rotor, sempre seguindo as instruções do fabricante.
- C. Feche a tampa da câmara e ajuste a temperatura, conforme desejado.
- D. Coloque o controlador da duração da corrida em posição de espera, ou no tempo desejado.
- E. Selecione a velocidade (angular) desejada. Selecione a frenagem, caso necessário, ao final da corrida.
- F. Aperte a tecla de início. A centrífuga irá acelerar até a velocidade selecionada, correr durante o intervalo de tempo selecionado e automaticamente desacelerar ou frear até a parada completa. Nos modelos com memória, as condições da corrida podem ser armazenadas e automaticamente reproduzidas para outros conjuntos de amostras.

4.6. Em Caso de Alarme de Escovas Gastas

- Se o alarme de escovas gastas se ativar durante uma centrifugação, não é necessário interromper a corrida. Quando ela terminar, um sistema de travamento geral impedirá novas corridas, até que o problema seja sanado.

4.7. Referências Bibliográficas

RICKWOOD, D.; FORD, T.C.; STEENSGAARD, J. *Centrifugation. Essential data series*. New York: John Wiley & Sons, 1994. 128 p.

RICKWOOD, D. *Preparative centrifugation: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1992. 400 p.

5. ESPECTROFOTOMETRIA

CUIDADOS

- Não toque a superfície de leitura da cubeta. Caso isso ocorra, limpe a mesma **IMEDIATAMENTE**, com papel toalha.
- Manuseie a cubeta com cuidado, para evitar derramamentos da amostra no aparelho. **PRINCIPALMENTE** se estiver utilizando antrona.

5.1. Introdução

A espectrofotometria é fundamental para a pesquisa bioquímica, destacando-se as seguintes situações: (a) se o índice de absorvância a um comprimento de onda específico for conhecido, a *concentração de um composto* pode ser estimada por meio da determinação de sua densidade ótica naquele comprimento de onda, (b) medindo-se a taxa de formação ou degradação de um composto que absorva radiação, *o curso de uma reação pode ser determinado*, e (c) *compostos podem ser identificados* através da determinação de seus espectros de absorção nas regiões visível e ultravioleta do espectro de energia radiante.

5.2. Fundamento

A espectrofotometria se baseia em duas leis básicas: a de Lambert e a de Beer. A primeira enuncia: “*A radiação absorvida é diretamente proporcional à espessura da solução analisada*”. Portanto, temos a equação:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = a_s \cdot b$$

em que: I_0 = intensidade da radiação incidente
 I = intensidade da radiação transmitida
 a_s = índice de absorvância característico para a solução
 b = comprimento do meio
 A = absorvância

A segunda enuncia: “*A radiação absorvida é diretamente proporcional à concentração do soluto na solução*”. Portanto, temos a equação:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = a_s \cdot c$$

em que: I_0 , I , a_s e A são como na equação anterior e c = concentração do soluto na solução

Combinando-se as duas leis, obtém-se a expressão: $A = a \cdot b \cdot c$. O índice de absorvância pode ser determinado a partir desta equação, fazendo o seguinte rearranjo, no qual o valor de b pode ser mantido constante através do uso de cubetas padronizadas:

$$a_s = \frac{A}{cb}$$

5.3. Limitações da Lei de Lambert-Beer

- Tomada isoladamente, a relação direta entre absorvância e concentração possui poucas exceções. Todavia, a adição do componente b (espessura da solução) em valor constante (uso de cubetas padronizadas) gera desvios químicos e interferência na aparelhagem.
- Essa lei é válida somente para soluções diluídas. Em altas concentrações (> 10 mM), cada uma das partículas afeta a distribuição de carga de suas vizinhas. Isso pode alterar as características da solução em absorver um comprimento de onda específico.
- A presença de eletrólitos na solução modifica o potencial de absorção molar do componente absorvedor de radiação. Esse efeito, contudo, pode ser reduzido por diluições adicionais.
- Desvios desta lei serão observados quando a substância analisada se dissocia, associa ou reage com o solvente, gerando um produto com espectro de absorção diferente da substância original. Ex. indicadores ácido-base.
- Essa lei é observada somente com radiação monocromática. Quando mais de um comprimento de onda é utilizado, a relação entre absorvância e concentração deixa de ser linear.

5.4. Espectrofotômetro

Uma variedade de espectrofotômetros está disponível comercialmente para medições de absorvância nas regiões ultravioleta, visível e infravermelha do espectro. Duas variáveis na concepção destes aparelhos são fundamentais, a saber:

5.4.1. Arranjo das Cubetas com Relação ao Seletor de Comprimento de Onda

As duas cubetas (branco e amostra) podem estar tanto entre a fonte de luz e o seletor de comprimento de onda quanto entre o seletor e o detector. Cada alternativa apresenta desvantagens e vantagens. Na primeira, qualquer fluorescência na amostra produzirá interferência nas medições. Em compensação, a dispersão da radiação causada por componentes da amostra terá pouca importância, porque será, posteriormente, rejeitada pelo seletor. Já na segunda alternativa, o inverso é observado: a fluorescência ou a fotodecomposição será minimizada, porque os comprimentos de onda curtos serão removidos antes que possam atingir a amostra. Porém, há a possibilidade de erros por dispersão.

Na amplitude que nos interessa mais (UV e VIS), a fluorescência e a fotossensibilidade são problemas mais sérios do que a dispersão, predominando a concepção em que as cubetas ficam entre o seletor e o detector.

5.4.2. Sincronismo das Medições de I_0 e I e da Corrente no Escuro

Essa característica determina se o aparelho será de feixe único ou duplo. Em feixe único (figura 1-A), três passos são necessários: (a) zerar o instrumento com o disparador em posição,

(b) medir o branco (I_0) e (c) medir a amostra (I). Visto que a confiabilidade dos dados vai depender da constância das características de operação, as medições têm de ser rápidas.

Nos instrumentos de feixe duplo, um feixe passa através do branco e o outro através da amostra, simultaneamente. Esses aparelhos são de dois tipos, a saber:

- O feixe duplo (figura 1-B) é formado pela bifurcação de um único feixe em espelho em forma de V. Nesse caso, a medição ocorre em dois passos: (a) zerar o aparelho com o disparador em posição e (b) medir a amostra (e o branco). A confiabilidade dos dados depende da constância da corrente no escuro (quando a radiação não está passando), durante os dois passos.
- O aparelho não possui disparador (figura 1-C). Em vez disso, um espelho giratório, com movimento de 1/4 de círculo, direciona a radiação do seletor para o branco e para a amostra, em alternância. Assim, o feixe duplo na verdade ocorre no tempo e não no espaço. Os dois pulsos de radiação são recombinados por um espelho de grade, o qual transmite um e reflete o outro para o detector. O espelho de setor é composto por segmentos arredondados, sendo metade abertos, para passagem livre de radiação. Os componentes espelhados possuem moldura metálica, que periodicamente interrompe o feixe direcionado para o detector. Nesse ponto, o microprocessador do detector faz ajustes na corrente no escuro. Por esse processo, o feixe que passa pelo branco é atenuado mecanicamente, até que sua intensidade seja igual à do feixe que está passando pela amostra. Quando os microprocessadores são capazes de efetuar retroalimentação, o ajuste é eletrônico. A medição da amostra, nesse caso, é direta, sem necessidade de passos adicionais. Outra vantagem desse modelo é a medição contínua, mesmo quando se muda o comprimento de onda.

5.5. Operação Típica em Feixe Único

- A. Ligue o aparelho. Embora o aparelho possa ser usado imediatamente, melhor desempenho é obtido após uma espera para aquecimento. Equipamentos mais recentes executam autocalibração, informando quando estão prontos para uso.
- B. Selecione o comprimento de onda desejado. Nos modelos UV, a amplitude é geralmente de 200 a 1.000 nm. Ajuste a posição do espelho para a lâmpada requerida para o comprimento de onda em uso. Tipicamente, existe uma alavanca para seleção de lâmpada de deutério (UV) ou tungstênio (VIS). **Essa lâmpada requer aquecimento de, no mínimo, 10 min.**
- C. Verifique, no seletor de comprimento de onda, a indicação para uso de lâmpada de tungstênio ou deutério. Normalmente existe uma faixa exclusiva para a VIS, outra para a UV e uma intermediária, na qual se escolhe a lâmpada que propicia maior T, quando não há amostra colocada no compartimento.
- D. Use cubetas da espessura certa, de acordo com o procedimento que estiver conduzindo. Use cubetas idênticas em espessura para as amostras, brancos e padrões.
- E. Coloque o branco em uma cubeta e a insira no compartimento de amostra. A solução deve estar em altura suficiente para cobrir o feixe de luz que passa através do compartimento. Algumas cubetas possuem uma marca horizontal para indicar o nível adequado de enchimento. As cubetas possuem uma marca vertical, que serve de referência para o alinhamento desta com a marca vertical no compartimento de amostra.
- F. Feche a tampa do compartimento de amostra e selecione o modo de operação: transmitância, absorvância ou concentração. Remova o branco e faça as leituras nas amostras ou padrões.
- G. Observe os seguintes procedimentos:
 - a) Absorvância ou Transmitância:
 - Insira cada amostra ou padrão no compartimento de amostras, fazendo a leitura.

- Faça a curva padrão, ou a regressão, colocando a absorbância ou transmitância como função (ordenada) das concentrações das soluções contendo os padrões (abscissa).
- Determine a concentração de cada amostra, examinando na curva padrão qual valor de concentração (abscissa) corresponde à absorbância ou transmitância obtida (ordenada). Caso necessário, faça correções contra interferências.

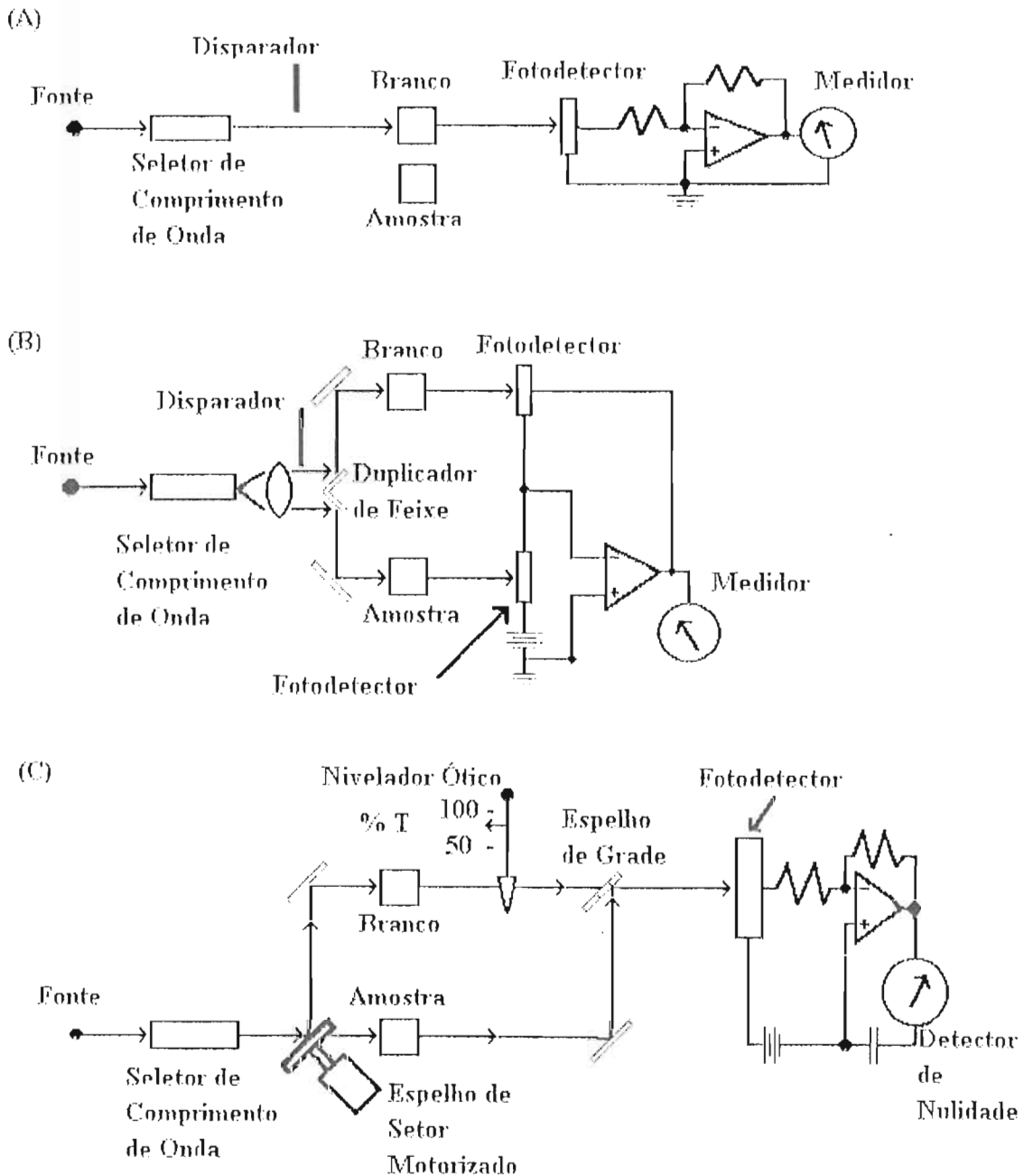


FIGURA 1. Esquemas de operação de fotômetros e espectrofotômetros: (A) feixe único, (B) canal duplo com feixes simultâneos, e (C) feixe duplo, com alternância entre dois canais (adaptado de Skoog, 1985).

b) Concentração:

- Este módulo somente pode ser usado para relações lineares. Coloque o padrão no compartimento das amostras e digite ou faça o ajuste do valor da concentração. Repita este passo com outros padrões, para verificação.
- Insira as amostras no compartimento de amostras e leia os resultados diretamente em unidades de concentração.

5.6. Referência Bibliográfica

SKOOG, D.A. *Principles of instrumental analysis*, 3.ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1985. 879 p.

6. SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

6.1. Introdução

Em muitos procedimentos é necessário purificar a substância em estudo, removendo os possíveis interferentes. Geralmente, essa remoção é conseguida através de técnicas de fracionamento, das quais a cromatografia é uma das mais utilizadas.

O termo *cromatografia* engloba um grupo diversificado de métodos de separação, isolamento e identificação de compostos correlatos em misturas complexas. Todos eles compartilham o uso de duas fases: uma *estacionária* e a outra, *móvel*. Os componentes da mistura são carregados ou *corridos* através da fase estacionária, pelo fluxo da fase móvel. As separações se baseiam nas diferenças das taxas de migração entre os diferentes componentes da mistura.

Inúmeras variações das técnicas cromatográficas estão descritas na literatura, envolvendo aparatos com variados graus de complexidade. Neste capítulo, são apresentadas descrições gerais de alguns métodos, relevantes para a fisiologia vegetal. As variações mais complexas não são abordadas, devendo o leitor consultar relatos mais abrangentes, tais como Stock & Rice (1974), Skoog (1985) ou Fallon et al. (1987).

6.2. Modalidades

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de duas maneiras. A primeira diz respeito ao meio físico pelo qual as fases móvel e estacionária são colocadas em contato, a saber:

- *Cromatografia em Coluna*: a fase estacionária é confinada em um tubo, através do qual ocorre a passagem forçada da fase móvel, por pressão ou gravidade.
- *Cromatografia Plana*: a fase estacionária se apóia em uma placa plana ou nos interstícios de uma folha de papel. A fase móvel se desloca na fase estacionária por capilaridade ou gravidade.

Vale salientar que os equilíbrios nos quais as duas modalidades se baseiam são idênticos e que a teoria aplicada a uma é prontamente adaptável à outra.

A segunda maneira de se classificar os métodos baseia-se nos tipos de fases móvel e estacionária e nos tipos de equilíbrio envolvidos na transferência de solutos entre as duas fases. Nesse caso, as categorias predominantes são a *Cromatografia Líquida* e a *Gasosa*, cada uma possuindo métodos específicos. No caso de *coluna*, esses métodos são apresentados na tabela 1.

6.3. Cromatografia em Coluna

A fase estacionária sólida (amido, talco, etc.) é comprimida em uma coluna de vidro (figura 2), enquanto o líquido (onde estão as substâncias que se quer separar) flui gradualmente, através da coluna. As substâncias possuindo maior afinidade pela fase sólida movem-se mais devagar do que aquelas com maior afinidade pela fase líquida, as quais aparecem nas primeiras frações coletadas no vaso receptor.

Na *cromatografia de partição em colunas*, o enchimento (leito) da coluna recebe um líquido que atua como fase líquida estacionária. Ele deve ser insolúvel na fase líquida móvel, para que as substâncias sejam separadas em função das suas solubilidades relativas nos dois líquidos.

O termo *adsorção* pressupõe que uma das fases é uma superfície competindo pelo soluto em termos de adsorção e a outra é um líquido. O termo *partição* pressupõe que ambas as fases são líquidas ou que uma delas é gasosa e a outra líquida.

TABELA 1. Métodos de separações cromatográficas em colunas (adaptado de Skoog, 1985).

Classificação	Método Específico	Fase Estacionária	Tipo de Equilíbrio
Cromatografia Líquida	Líquido-líquido	Líquido adsorvido em um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido	Sólido	Adsorção
	Fase líquida retida	Espécies orgânicas retidas em uma superfície sólida	Partição-adsorção
	Troca iônica	Resina de troca iônica	Troca iônica
Cromatografia Gasosa	Impregnação de gel	Líquido nos interstícios de um sólido polimérico	Partição-peneiramento
	Gás-líquido	Líquido adsorvido em um sólido	Partição entre gás e líquido
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
	Fase gasosa retida	Espécies orgânicas retidas em superfície sólida	Partição-adsorção

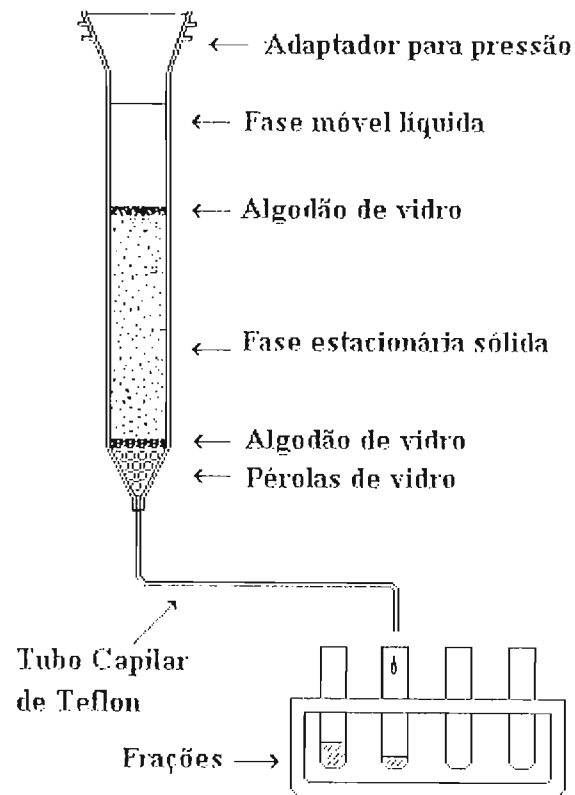


FIGURA 2. Diagrama da cromatografia em coluna.

6.3.1. Cromatografia de Eluição

Nesta variação, a amostra é eluída gradualmente, através de adições sucessivas de solvente. Após aplicada, a amostra migra até uma certa extensão, ficando seus componentes fracionados em parte da coluna. Novas aplicações de solvente forçam novos avanços da *frente*, causando novo fracionamento, desta vez na porção ainda virgem da fase estacionária. Ao mesmo tempo, ocorre um fracionamento adicional, no ponto onde a amostra foi aplicada.

Adições continuadas do solvente empurram as moléculas do soluto em uma série contínua de transferências entre as fases móvel e estacionária. Visto que a movimentação do soluto só pode ocorrer na fase móvel, **a taxa na qual o soluto migra depende do intervalo de tempo que ele permanece na fase móvel**. Esse intervalo é curto, para solutos com alta afinidade pela fase estacionária, e longo, para solutos com alta retenção na fase móvel. Nos casos ideais, as diferenças nas taxas de migração forçam os componentes de uma mistura a se separar em bandas, distribuídas ao longo da coluna. O isolamento das bandas separadas é conseguido através da passagem do solvente, em quantidade suficiente para forçar cada banda para fora da coluna, onde as frações serão coletadas em recipiente adequado.

Nos aparelhos comercializados, um detector de concentração é colocado no final da coluna e seu sinal é lançado em gráfico, como função do tempo necessário para a migração. Obtém-se então uma figura com vários picos de tempo, estratificados de acordo com a distância percorrida ao longo da coluna. A posição dos picos, tendo o *tempo de migração* na abcissa, pode servir para identificar os componentes da amostra. As áreas abaixo dos picos, tendo a *distância percorrida* na abcissa, fornecem uma medida quantitativa de cada componente.

6.3.2. Cromatografia de Afinidade

Os procedimentos para purificação de proteínas passaram a ter maior rendimento com o uso da cromatografia de afinidade (Cuatrecasas & Christian, 1971), que explora a habilidade desses compostos em se associar de maneira específica, porém reversível, com substâncias ligantes. Basicamente, a coluna é preparada através da indução de ligação covalente entre sua matriz (ou leito) e um ligante, específico para a substância a ser separada. Após aplicada a amostra, a substância de interesse ficará retida ao ligante, enquanto os demais componentes irão passar normalmente através da coluna. A retenção ocorre em proporção à afinidade existente entre o ligante e a substância que está sendo separada.

A substância adsorvida será depois eluída, ao se alterar o solvente usado, para provocar dissociação. A técnica pode ser usada, com escolha dos adsorventes adequados, para purificar enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, proteínas de ligação de vitaminas, estruturas receptoras de hormônios e peptídeos de síntese orgânica. Os seguintes pontos podem ser enfatizados no processo:

- O gel acoplado deve ser lavado (ex. solução aquosa de dimetil formamida 50% v/v) exaustivamente, para remoção do material sem ligação covalente.
- É necessário um método para determinar a quantidade de material preso ao suporte sólido. Ex.: determinação do ligante liberado (absorbância, marcadores radioativos, análise de aminoácidos, etc.) em seqüência a uma hidrólise ácida ou alcalina.
- As condições de eluição obedecem às propriedades da proteína a ser isolada. Sem alterações, a proteína adsorvida é obtida em concentrações diluídas. Na maioria dos casos, é necessário alterar-se o pH, a força iônica ou a temperatura do tampão.

Para o suporte da fase estacionária sólida, embora os derivados de celulose possam ser vantajosos em alguns casos (ex. nucleotídeos), seu caráter fibroso e desuniforme impede a penetração adequada de moléculas protéicas maiores. Polímeros altamente hidrofóbicos, como o poliestireno, apresentam péssima comunicação entre as fases sólida e aquosa. Por isso, predomina o uso de polímeros de polissacarídeos hidrofílicos, tais como o *Sephadex*, que apresentam as seguintes vantagens: (a) interação fraca com as proteínas em geral, minimizando a adsorção não específica; (b) boas propriedades de fluxo, que são retidas após a ligação e (c) grupos químicos que podem ser ativados ou modificados, sob condições que não afetam a matriz de separação. Atualmente, derivados perolizados de agarose têm sido intensamente usados, por satisfazerem, praticamente, todas as propriedades de um adsorvente ideal.

6.3.3. Cromatografia de Troca Iônica

Essa modalidade apresenta alta resolução, sendo útil no fracionamento de compostos biológicos similares a partir de diferenças nas cargas dos solutos. Para isso, são empregados permutadores iônicos, tais como o CM, DEAE, SP e QAE, os quais são insolúveis. Ao adicionar a amostra em uma coluna catiônica, os cátions ficarão retidos, enquanto as substâncias com cargas negativa ou neutras irão passar livremente. Em seguida, estes cátions são removidos, pela adição de um eluente com maior força iônica ou diferente pH. Trocadores com carga positiva recebem ânions e são chamados de trocadores aniônicos. Aqueles com carga negativa recebem cátions e são chamados de trocadores catiônicos.

O fracionamento por troca aniônica é obtido por adsorção reversa, geralmente em dois estádios principais. O primeiro consiste na aplicação e adsorção da amostra, em que substâncias não ligadas podem ser forçadas para fora da coluna pela injeção do tampão inicial, em volume idêntico ao da coluna. O segundo envolve a eluição de substâncias fracionadas com base nas diferenças de afinidade que elas apresentam pelo trocador aniônico empregado. Essa afinidade (ou seja, variação na carga negativa), pode ser controlada, variando-se o pH e a força iônica do eluente. Visto que os compostos biológicos apresentam grandes diferenças em suas propriedades de carga e o método tem alta sensibilidade, até mesmo duas proteínas diferindo apenas por um único aminoácido podem ser separadas.

6.3.4. Cromatografia de Adsorção em Leito Expandido

Uma solução promissora para os problemas de se aplicar amostras contendo partículas em um leito comprimido é o uso de leitos expandidos, ou fluidizados (figura 3), conforme proposto por Chase (1994). Quando um líquido é bombeado, de baixo para cima, através de um leito de pérolas adsorventes que não sofre restrição de adaptadores de fluxo apicais, esse leito pode se expandir, abrindo espaços entre as pérolas.

Visto que as propriedades físicas do leito e das partículas presentes na solução-estoque contendo a amostra diferem significativamente, essas partículas podem então passar livremente, através dos espaços criados, sem serem capturadas. Uma velocidade mínima do líquido é necessária, antes que o leito comece a se expandir. Todavia, os espaços entre as pérolas aumentam, posteriormente, à medida que a velocidade de passagem do líquido aumenta. Quando o leito estiver com o dobro da altura original, as partículas passarão, enquanto o adsorvente será retido. A velocidade de passagem possui um máximo, para que o líquido não carregue as pérolas também.

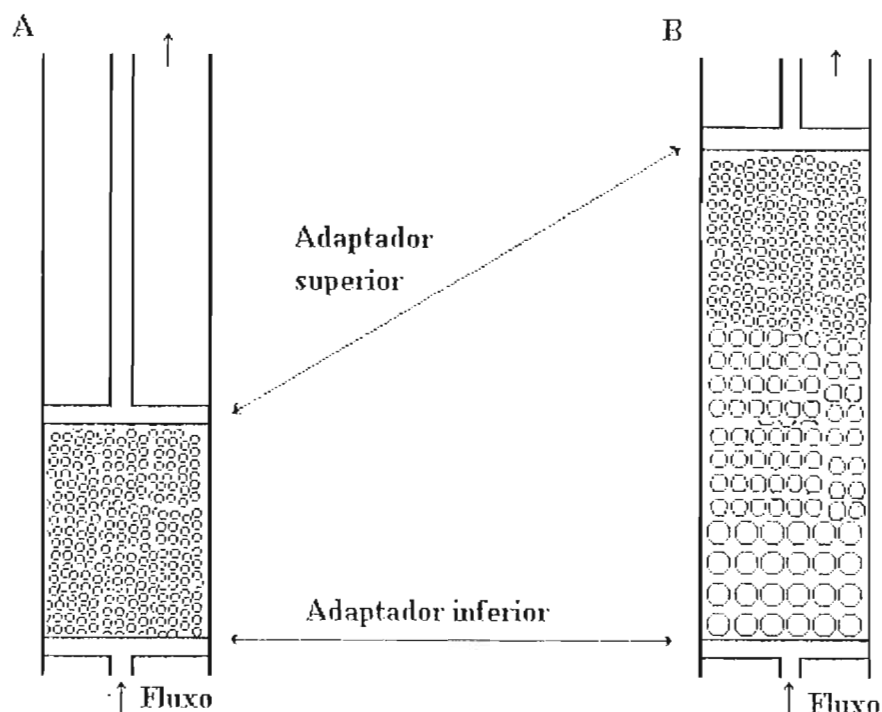


FIGURA 3. Comparação entre um leito comprimido (A) e um expandido (B), estável. Os diâmetros das pérolas adsorventes e sua distribuição estão fora de proporção, para clareza (adaptado de Chase, 1994).

Como alternativa, o fluxo de injeção do tampão e da amostra podem ser controlados individualmente, por meio de bombas separadas (Hansson et al., 1994). Nesse caso, eles poderão ser aplicados em mistura, ou em separado, a um fluxo constante. A compressão do adaptador superior força a eluição.

6.4. Cromatografia em Papel

Neste método, uma tira de papel-filtro substitui a coluna com a fase sólida comprimida. Um solvente orgânico parcialmente miscível com a água (ex. n-butanol) corre na fase sólida, de cima para baixo ou de baixo para cima, por capilaridade. No processo, ele carrega consigo a classe de compostos da amostra, separando os componentes de acordo com sua solubilidade no solvente. Quando a frente do solvente se aproxima do final do papel, ela é removida e o papel colocado para secar. Na revelação, os componentes individuais são identificados, através da comparação com padrões submetidos a condições de corrida idênticas.

Na cromatografia descendente em papel (Chase & Rabinowitz, 1970), faz-se uma pequena marca a lápis (*linha de largada*) na ponta de uma tira de papel-filtro. Uma pequena alíquota da solução contendo os compostos a serem separados é aplicada nessa marca e deixada evaporar (figura 4). A tira de papel é então pendurada dentro de um tanque de cromatografia, ficando apoiada, na extremidade superior, por uma calha contendo solvente. Um bastão de vidro é usado como contrapeso, para impedir que o papel escorregue da calha. O solvente é derramado na calha e uma pequena quantidade no tanque. O tanque é selado para prevenir evaporação do solvente. A *frente do*

solvente é acompanhada, à medida que desce pela tira de papel, e o processo é interrompido antes que a *frente* atinja a extremidade inferior da tira. A tira é então removida e a posição da *frente* do solvente é imediatamente marcada, antes que evapore. A tira é, a seguir, pendurada para secar.

Se a escolha de solventes e o método de coloração forem adequados, os compostos ficarão visíveis, em posições diferentes ao longo da tira de papel. Caso os pontos sejam incolores, suas posições poderão, geralmente, ser determinadas por exame sob UV.

O valor de R_f pode auxiliar na identificação do composto. Em cromatografia, ele é definido como a razão entre a distância d_c , percorrida pelo composto, e a distância d_s , percorrida pela frente do solvente, ou seja:

$$R_f = \frac{d_c}{d_s}$$

Na cromatografia ascendente em papel, o solvente é colocado no fundo do tanque e a tira de papel é apoiada de tal forma, que sua ponta inferior fique mergulhada no solvente. A *linha de largada* é marcada na base da tira (vide exemplo no capítulo 11, item 11.5.).

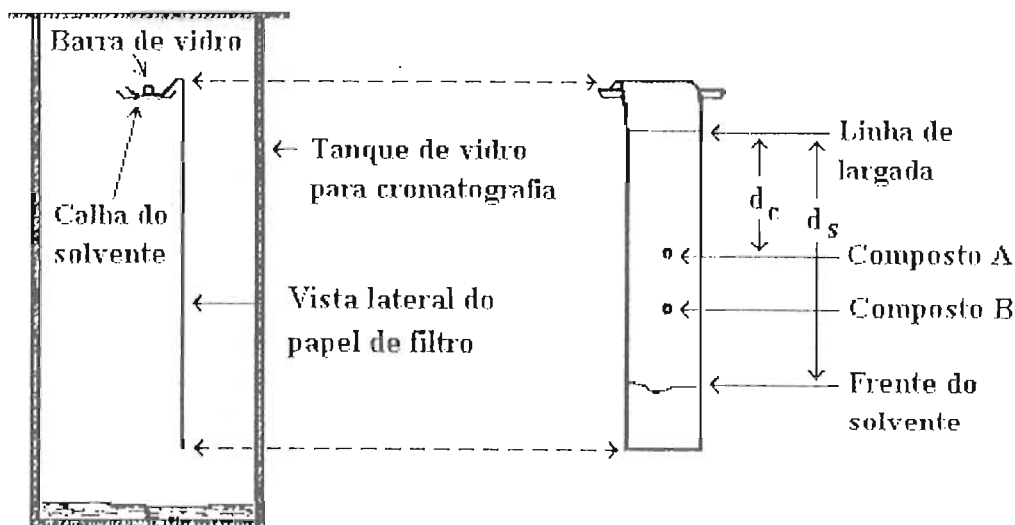


FIGURA 4. Diagrama da cromatografia descendente em papel, em que: d_c = distância percorrida pelo composto e d_s = distância percorrida pela frente do solvente (adaptado de Chase & Rabinowitz, 1970).

6.5. Cromatografia de Camada Fina (TLC)

Nesta técnica, a cromatografia é conduzida em camadas abertas de materiais adsorventes, apoiados sobre placas de vidro (vide Touchstone, 1992). O método possui diversas vantagens sobre a cromatografia em papel, a saber:

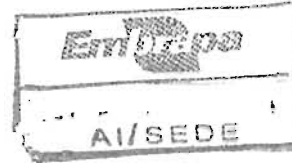
- Separação rápida: manchas com boa resolução são obtidas entre 5 e 60 minutos de corrida, dependendo do grau de complexidade do composto a ser separado. A maior velocidade, em comparação com a cromatografia em papel, se deve à maior compactidade da fase sólida.
- Maior resolução, podendo-se separar um maior número de compostos.

- Maior capacidade: amostras contendo até 100 mg da substância de interesse podem ser separadas, tornando o método apropriado para fracionamentos.
- Alta sensibilidade: compostos presentes na amplitude de nanogramas podem ser separados.

As camadas adsorventes são obtidas com o preparo de uma pasta fluida e subsequente aplicação da mesma, em camadas de espessura uniforme, sobre as placas de vidro. O solvente mais comum é a água destilada. Normalmente, várias placas são preparadas de uma vez, sobre uma bandeja rasa. A aplicação da pasta fluida é feita com espalhadores, especialmente projetados para controlar a espessura, ou com borrifações. O uso de ar comprimido, minutos após a aplicação da pasta fluida, permite que as camadas finas se assentem, antes que as placas possam ser manuseadas. Suportes para armazenagem de várias placas podem ser usados para proteger as placas, mesmo durante a condução da cromatografia. Neste método, a separação também se baseia na partição líquido-líquido dos compostos.

6.6. Referências Bibliográficas

- CHASE, G.D.; RABINOWITZ, J.L. **Principles of radioisotope methodology**, 3.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1970. 633 p.
- CHASE, H.A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.12, p.296-298, 1994.
- CUATRECASAS, P.; ANFINSEN, C.B. Affinity chromatography. In: JAKOBY, W.B. ed. **Methods in enzymology**, v.22. Enzyme purification and related techniques. New York: Academic Press, 1971. p.345-378.
- FALLON, A.; BOOTH, R.F.G.; BELL, L.D. **Applications of HPLC on biochemistry: laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: Elsevier, 1987. 338 p.
- HANSSON, M.; STÄHL, S.; HJORTH, R.; UHLÉN, M.; MOKS, T. Single-step recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption. **Bio/Technology**, New York, v.12, p.285-288, 1994.
- SKOOG, D.A. **Principles of instrumental analysis**, 3.ed. London: Chapman and Hall, 1985. 383 p.
- STOCK, R.; RICE, C.B.F. **Chromatographic methods**, 3.ed. London: Chapman and Hall, 1974. 383 p.
- TOUCHSTONE, J.C. **Practice of thin layer chromatography**, 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1992. 377 p.



7. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

CUIDADOS

- A acrilamida e a bisacrilamida são toxinas de penetração cutânea. Use luvas.
- Armazene a solução de SDS em vidro âmbar, a 0°C.
- O preparo das amostras é importante para se obter separação precisa com base no PM. O tratamento a ser aplicado na amostra tem de destruir estruturas protéicas secundárias ou terciárias, para que elas não alterem a migração das proteínas na acrilamida.
- É crucial que o preparo das amostras solubilize e desnature as proteínas, dissocie os polipeptídeos e reduza as ligações bissulfídicas. Essas metas são alcançadas por meio da combinação do uso de SDS, um agente redutor e calor.

7.1. Introdução

A eletroforese baseia-se na migração de moléculas em resposta à aplicação de um campo elétrico, produzindo bandas separadas por PM, densidade ou carga elétrica. A revelação das bandas é feita com corantes, mostrando tamanho, intensidade da cor e distância do ponto de aplicação, os quais são usados para comparar as amostras. Esse princípio vem sendo amplamente utilizado para o estudo de proteínas nativas e desnaturadas (Weber & Osborn, 1975).

Existem várias técnicas de eletroforese para a caracterização de proteínas (ex. Hames & Rickwood 1990, Alfenas et al. 1991 e Patel 1994). Todavia, o fracionamento de proteínas desnaturadas em géis verticais de SDS-PAGE é a técnica preferível, dada a rapidez, alta resolução e facilidade de uso. Neste capítulo, é descrita uma adaptação do método de Laemmli (1970).

7.2. Fundamento

O objetivo do método é a separação de proteínas presentes em misturas complexas. Inicialmente, a amostra é desnaturada por aquecimento, na presença de SDS e um agente redutor. O SDS é usado para envolver as moléculas protéicas, enriquecendo-as com cargas negativas, em proporção ao comprimento da molécula. Visto que a carga negativa induzida pelo SDS é de grande magnitude, a separação primária ocorre com base no PM. A elevada resolução das bandas reveladas é obtida pelo uso de um sistema descontínuo de géis, o qual possui uma camada de gel de concentração e outra para a separação das bandas (gel de corrida). Esses dois géis podem diferir na concentração de sais, no pH, na concentração de acrilamida, ou na combinação desses fatores.

Durante a corrida, as proteínas são separadas pela carga elétrica e pela sua retenção nos poros do gel. Isso permite o uso de géis em gradiente de concentração de acrilamida, em que uma amplitude maior de PMs pode ser separada. A estimativa do PM é conseguida pelo uso, em cada gel, de marcadores de peso molecular, disponíveis comercialmente.

Além da separação de componentes protéicos pelo tamanho, a SDS-PAGE é utilizada para a estimativa do grau de pureza de uma proteína em uma solução, para a purificação de espécies protéicas por outros processos e para o fracionamento de misturas de proteínas (ex. transferência para outra matriz), antes de se iniciar um *Western blot*. Em geral, os métodos não apresentam grande variação entre aplicações e qualquer dos diferentes relatos disponíveis na literatura irá propiciar resultados aceitáveis.

7.3. Extração e Preparo das Amostras

- A. Triture 1 g de segmentos basais foliares em gral de porcelana a 4°C contendo 5 mL de tampão PEB 20 mM pH 3.0.
- B. Separe o extrato protéico (filtração ou centrifugação a 5.000 x g, por 10-15 min, a 4°C).
- C. Determine o teor de proteína de cada amostra pelo método de Lowry (vide capítulo 8).
- D. Adicione dois volumes de tampão da amostra (item 7.8.) e incube a mistura em banho-maria (temperatura > 95°C) por 2-5 min. Agite a amostra em *vortex* antes, durante e após o tratamento de calor.

7.4. Procedimento Típico

- A. Prepare as soluções-estoque de poliacrilamida e tampão de corrida (itens 7.7.1. e 7.7.2.).
- B. Lave as placas de vidro para montagem do gel com sabão neutro. Enxágüe exhaustivamente com água destilada. Deixe-as secar à temperatura ambiente. **Não toque na superfície das placas de vidro; procure manuseá-las pelas bordas.** Caso necessário, use éter sulfúrico e etanol.
- C. Monte o molde do gel (em geral, 16 cm x 16 cm), utilizando os espaçadores e prendedores, sobre superfície plana. Posicione o molde sobre o suporte, prendendo-o com os pinos.
- D. Aplique, opcionalmente, um gel de vedação (item 7.9.) até à altura de, aproximadamente, 1 cm, e espere o mesmo polimerizar (cerca de 30 min), verificando se está ocorrendo vazamento na base. Caso afirmativo, o molde tem de ser montado outra vez.
- E. Coloque o gel de corrida (item 7.9.), imediatamente após o preparo, até uma altura previamente definida (geralmente, 1 cm abaixo da altura onde estarão os fundos dos poços para amostra).
- F. Coloque água ou n-butanol sobre o gel de corrida, para promover a polimerização.
- G. Retire a água, após cerca de 45 min. Aplique o gel de concentração (item 7.9.) e encaixe o pente. **Não deixe formar bolhas.** Remova o pente, após cerca de 20 min.
- H. Encaixe o adaptador de borracha sobre as duas placas e, em seguida, o recipiente do tampão superior, fixando-o firmemente com os pinos laterais.
- I. Coloque o tampão de corrida (item 7.7.2.) no recipiente superior e, em seguida, no inferior e transfira as placas para a posição definitiva. Incline o recipiente, para evitar a formação de bolhas sob os dois géis.
- J. Padronize o teor protéico das alíquotas das amostras em 20 µg. Caso alguma amostra esteja diluída, concentre o nível protéico por precipitação em TCA e subsequente ressuspensão no tampão da amostra. Para isso, adicione TCA até a concentração de 10% (p/v), mantenha a 4°C por 5 min, centrifugue e lave o sedimento protéico com acetona a 4°C.
- K. Aplique as amostras com micropipeta, da esquerda para direita. Use o primeiro poço para aplicação dos marcadores de PM (item 7.11.). Tente ser rápido e, ao mesmo tempo, preciso, para minimizar difusão das amostras.
- L. Conecte os pólos positivo (+; **vermelho**) e negativo (-; **preto**) da fonte de energia nas posições correspondentes no topo do suporte dos géis. Ligue a fonte de energia e conduza a eletroforese, observando os detalhes do item 7.7.
- M. Desligue a fonte de energia, remova o suporte contendo os géis e transfira os mesmos para o recipiente de coloração (item 7.10.).

7.5. Uso de Circulação Para Controle de Temperatura ou pH

- Normalmente, a corrida é feita em temperatura ambiente. Alguns sistemas podem ser conectados a um banho-maria com circulação de água, para manutenção da temperatura. Isso é importante, porque a resistência dos poros do gel à passagem dos fragmentos de proteína gera calor. O

aquecimento aumenta diretamente com a concentração da poliacrilamida, podendo causar perda de resolução. Por isso, em alguns métodos, a corrida ocorre abaixo da temperatura ambiente. Todavia, temperaturas $< 10^{\circ}\text{C}$ inibem a mobilidade das proteínas, estendendo a duração da corrida, e tendem a precipitar o SDS.

- Para corridas longas ou necessidade crítica de controle do pH, será necessário circular a solução-tampão dos eletrodos, através do uso de bomba peristáltica.

7.6. Módulo de Operação e Duração da Corrida

- A escolha do modo de operação depende se o sistema de tampão é contínuo ou descontínuo. No contínuo, as mudanças na resistência do gel são pequenas e o modo de operação não é crítico. No descontínuo, todavia, ocorrem aumentos na resistência, recomendando-se o uso de *corrente constante*, que permite queda constante de voltagem no gel, independente das mudanças na solução-tampão usada para os eletrodos. Em geral, os modos de operação, em temperatura ambiente, tendem a apresentar as seguintes características:

Voltagem Constante (mais utilizada)	Duração aproximada de 4 h, aplicando 75 V, até que o corante indicador (azul de bromofenol) atinja o gel de corrida e 150 V a partir desse ponto.
Corrente Constante	Duração aproximada de 8 h, aplicando 40 mA (para dois géis) ou 20 mA (para um gel), até que a frente atinja o gel de corrida e 80 ou 40 mA a partir desse ponto.
Ajustes na Fonte de Energia	<ul style="list-style-type: none"> • Marque o tempo para a corrida. • Escolha a amplitude de corrente desejada. • Selecione a corrente desejada e o limite de voltagem.

7.7. Soluções-Ístoque

7.7.1. Poliacrilamida

Solução A:	Acrilamida N,N'- metileno-bisacrilamida Água Destilada q.s.p	29,2 g 0,8 g 100 mL
Solução B:	Tris HCl 1 N até obtenção de Água Destilada q.s.p.	18,15 g pH 8,8 100 mL
Solução C:	Tris HCl 1 N até obtenção de Água Destilada q.s.p.	6,0 g pH 6,8 100 mL
Solução D	SDS 10% (p/v)	
Solução E*	PSA 10% (p/v)	

*Preparada imediatamente antes do uso.

7.7.2. Tampão de Corrida

Tris-Glicina, pH 8,3:	Tris	4,5 g
	Glicina	21,6 g
	SDS	21,6 g
	Água Destilada q.s.p.	1,5 L

- Armazene o tampão a 4°C. Para usá-lo, dilua 200 mL em 800 mL de água destilada.

7.8. Tampão da Amostra

Tampão Tris-HCl 0,5 M, pH = 6,8	1,0 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS a 10% (p/v)	1,6 mL
BME	0,4 mL
Solução de Azul de Bromofenol 0,2% (p/v)	0,2 mL

7.9. Preparo dos Géis

Tipo de Gel	Soluções	Volume
Concentração	Solução A	3,22 mL
	Solução C	5,00 mL
	Solução D	200 µL
	Água	11,60 mL
	Desaere por	15 min
	Solução E	100 µL
	TEMED	20 µL
Corrida	Solução A	8,00 mL
	Solução B	6,00 mL
	Solução D	240 µL
	Água	9,62 mL
	Desaere por	15 min
	Solução E	100 µL
	TEMED	10 µL
Vedação	Solução A	3,00 mL
	Solução B	1,50 mL
	Solução D	60 µL
	Água	1,40 mL
	Solução E	25 µL
	TEMED	2,5 µL

Adicionados com leve agitação.

7.10. Revelação dos Géis

7.10.1. Coloração pelo Azul de Coomassie (Weber & Osborn, 1975)

Solução Corante:	Azul de Coomassie	1,25 g
	Ácido Acético	45 mL
	Metanol	225 mL
	Água Destilada	225 mL
Solução Descorante:	Etanol	45 mL
	Ácido Acético	90 mL
	Acetato de Etila	50 mL
	Água Destilada	850 mL

- Mergulhe os géis na solução corante por cerca de 2 h e depois na solução descorante, até a obtenção da intensidade desejada.

7.10.2. Coloração pela Prata (adaptado de Tunon & Johansson, 1984)

Solução Corante:	Solução NH_4OH 14,8% (v/v)	2,8 mL
	Solução de NaOH 0,36% (p/v)	42 mL
	Solução de AgNO_3 20%, gota a gota até ficar opalescente	
	Água destilada q.s.p.	200 mL
Solução de Revelação:	Ácido Cítrico 1% (p/v)	1,12 mL
	Formaldeído	100 μL
	Água Destilada q.s.p.	200 mL
Solução Fixadora:	Metanol	90 mL
	Ácido Acético	20 mL
	Água Destilada q.s.p.	200 mL

- Mergulhe os géis na solução corante por 15 min e depois na solução de revelação, até obter a coloração desejada. Interrompa a revelação pela adição da solução fixadora.

7.11. Uso do Formador de Gradientes

- Várias abordagens baseiam-se em géis de gradiente, geralmente 7-15 %. Eles produzem alta resolução de subunidades protéicas em uma grande amplitude de PM, com sensível redução na difusão e no alargamento de bandas.
- O formador de gradiente é composto por dois cilindros idênticos de acrílico, com parede espessa, presos a um suporte e interconectados na base por tubulação de *teflon*, no meio da qual se situa uma torneira, que fica fechada durante o enchimento dos cilindros e aberta durante a formação do gradiente.
- Um cilindro atua como *reservatório*, recebendo a poliacrilamida de menor concentração.
- O outro funciona como *misturador*, recebendo a solução de poliacrilamida de maior concentração. O misturador possui uma saída externa na base, também controlada por uma torneira, a qual é conectada, por tubo de *teflon*, a uma bomba peristáltica e daí até o topo da montagem do gel, onde o gradiente é aplicado.
- O misturador recebe uma barra de agitação magnética, pequena o suficiente para girar sem tocar nas paredes do cilindro.

- O aparato deve ser colocado sobre um agitador magnético. Coloque as duas soluções e, rapidamente, ligue o agitador magnético, abra a torneira interna, em seguida a externa e ligue a bomba peristáltica. Controle o fluxo através da velocidade do agitador magnético.

7.12. Marcadores de Peso Molecular

- Os seguintes marcadores (disponíveis comercialmente) são adequados para os procedimentos de Laemmli (1970) e de Weber & Osborn (1975):

Proteína	Origem	PM	Observação
Anidrase Carbônica	Eritrócitos Bovinos	29.000	-
Albumina, (Ovoalbumina)	Ovos	45.000	-
Albumina	Plasma Bovino	66.000	-
Fosforilase B	Músculo de Coelhos	97.400	Subunidade
β -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	116.000	Subunidade
Miosina	Músculo de Coelhos	205.000	Subunidade
Mistura (3,0 mg)	Todas as 6 proteínas	-	-

7.13. Análise dos Resultados

7.13.1. Secagem de Géis

- A secagem pode ser feita por métodos à vácuo, que proporcionam rapidez. Todavia, o gel poderá se partir, caso a secagem seja quebrada prematuramente. Geralmente, os géis são montados sobre fundo branco opaco e não podem ser usados em retroprojeter.

7.13.2. Fotografia

- Coloque o gel sobre um transiluminador e posicione uma régua de precisão no lado esquerdo, para calcular distâncias de migração a partir da fotografia.
- Fotografe o gel, usando filme ou revelação em preto e branco (melhor contraste que a cores).
- Use f/s 32 e exposição de 1/30s ou 1 s, para câmera de revelação instantânea.
- Use lentes 50 mm, filme ASA/ISO 100 e exposição de 1/60, para câmera 35 mm. Reduza o f/s em três posições (ou seja, aumente a abertura em três posições). A desvantagem, com relação ao passo anterior, é o tempo demandado para a revelação do filme.
- Use filtro amarelo ou laranja e iluminação indireta em géis corados pelo Azul de Coomassie, para melhorar o contraste. Naqueles corados pela prata, não há necessidade de artifícios.

7.13.3. Cálculo do R_f e Peso Molecular das Bandas

- Determine a mobilidade relativa (R_f) de uma proteína no gel, dividindo sua distância de migração, a partir do topo do gel até o centro da banda desta proteína, pela distância de migração da frente de azul de bromofenol a partir do topo do gel.
- Faça uma curva de calibração, a partir dos marcadores de PM, colocando o logaritmo do PM como função da R_f . Visto que é uma reta, use a regressão na calculadora.
- Estime o PM de cada banda obtida, usando o valor da respectiva R_f na regressão ou curva de calibração.

7.13.4. Auto-radiografia

- Em amostras marcadas com radioisótopos, as bandas poderão ser capturadas em filme de raio-X, após secagem. Geralmente, revelações aceitáveis só serão obtidas após 6-15 h de exposição.
- Utilizando ^{14}C , ^3H ou ^{35}S , o sinal poderá ser ampliado por fluorografia (infusão de cintilante orgânico no gel, antes da secagem, para converter a energia emitida pelo radioisótopo para o campo visível do espectro, ampliando o sinal). Nesse caso, o tempo de exposição (a 70°C) é reduzido para < 6 h.

7.14. Guia Para a Solução de Problemas Frequentes

Problema	Causa Provável	Solução
A. Vazamento na aplicação da poliacrilamida no suporte do gel	Vedação mal feita	- Lubrifique os espaçadores com graxa de silicone ou água.
B. Polimerização incompleta da poliacrilamida	Reagentes velhos ou de baixa qualidade Preparação inadequada da solução de poliacrilamida Desaeração mal feita	- A acrilamida/bisacrilamida deve ser usada até uma semana após preparo. - Use solução de PSA recém-preparada. - Misture o TEMED e o PSA uniformemente. - Desaere as soluções até que não haja mais formação de bolhas.
C. Frente de corrida em curva	Superaquecimento	- Esfrie o tampão para $10-15^\circ\text{C}$, antes de iniciar a corrida. - Use circulação de água dentro do aparato de montagem do gel. - Reduza a corrente ou a voltagem.
D. Bandas encurvadas	Condutância desigual Corrida muito lenta	- Idem ao item B. - Aumente a corrente ou voltagem.
E. Bandas difusas	Difusão antes da corrida Polimerização incompleta A resolução do método, para o tipo de proteína em estudo, está baixa	- Aplique as amostras mais rápido e inicie logo a corrida. - Idem ao item B. - Duplique a concentração de sais nos géis de concentração e de corrida. Todavia, conduza a corrida em voltagens menores.
F. Após a coloração, a frente de corrida aparece como uma banda escura	Componentes da amostra migraram junto com a frente	- Concentração de acrilamida está baixa e deve ser aumentada.

7.15. Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isozimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: U.F.V., 1991. 242 p.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1990. 383 p.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London. v.227. p.680-685, 1970.

PATEL, D. **Gel electrophoresis: essential data series**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 146 p.

TUNON, P.; JOHANSSON, K.E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in PAGE. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Amsterdam, v.9. p.171-179, 1984.

WEBER, K.; OSBORN, M. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. **The proteins**. v.1. New York: Academic Press, 1975. p.179-223.

8. PROTEÍNAS - ANÁLISE QUANTITATIVA

CUIDADOS

- O reagente de Folin é mais eficaz em pH 10-12.
- Para prevenir a desnaturação da proteína, faça as agitações gradualmente, evitando formação de espuma no padrão ou na amostra.
- Algumas proteínas são solúveis em acetona. Portanto, mantenha a acetona gelada (de preferência a -5°C) e evite, tanto quanto possível, as lavagens na filtração.
- O uso de tampões para a extração acarreta a quantificação apenas das proteínas que são solúveis nos tampões utilizados.
- O branco contém todos os compostos químicos da análise, exceto a amostra.
- Nas extrações a quente, use banho-maria ou placa de aquecimento; nunca a chama direta.

8.1. Introdução

A determinação do nível de proteínas é uma das análises mais comuns em fisiologia vegetal. Ela é usada, rotineiramente, sempre que ensaios de atividade enzimática são feitos e a expressão dos dados com base em unidades de proteína é freqüentemente a melhor maneira de se apresentar os resultados.

Existem várias técnicas para se determinar o nível de proteínas em plantas. Uma das mais tradicionais é o método Kjeldahl. Nesse procedimento, as amostras são digeridas e analisadas para amônia-nitrogênio. Para o cálculo do teor protéico, assume-se que, aproximadamente, 16 % da proteína total corresponde a nitrogênio. Embora não empreguemos esse método (requer equipamento próprio e consome tempo), ele é o preferível, em muitas situações. Deve-se ter em conta, todavia, que ele pode produzir resultados enganosos, visto que nitratos são parcialmente convertidos em amônia.

Uma diversidade de técnicas colorimétricas para análise de proteínas está também disponível na literatura. De um modo geral, vários desses procedimentos são mais rápidos e precisos do que o Kjeldahl, embora também não estejam livres de fontes de erro. Neste capítulo, são apresentados os métodos de Lowry, Biureto e Bradford, os quais são, talvez, os mais amplamente em uso na atualidade. Esses métodos assumem que a percentagem de aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas é praticamente constante. Este fato, em si, é uma fonte de erro. Deve-se também lembrar que os métodos colorimétricos em geral são sensíveis a íons, tampões e mudanças no pH ou na temperatura. Por último, a clorofila e outros pigmentos podem afetar os valores de absorbância. Apesar dessas limitações, vale salientar que esses métodos são efetivos e justificam seu uso.

8.2. Extração a partir de Material Despigmentado

8.2.1. Método da Acetona

- A. Macere 1 g de tecido em gral de porcelana com 50 mL de acetona a 4°C.
- B. Filtre em funil de *Buchner* com sucção e lave com acetona a 4°C, caso necessário.

- C. Deixe o filtrado secar em temperatura ambiente. Após remoção do papel-filtro, faça a pesagem do resíduo.
- D. Transfira o resíduo para tubos de centrifugação de polipropileno de 50 mL e adicione 10 mL de NaOH 0,1 N e misture bem, por 15 min, dissolvendo as proteínas.
- E. Centrifugue o extrato (1.000 x g em temperatura ambiente, por 10 min) e transfira o sobrenadante para um cilindro graduado de 100 mL (filtre o extrato se o sedimento não estiver sólido).
- F. Trate o resíduo duas vezes mais com NaOH 0,1 N, centrifugue ou filtre o extrato e colete o sobrenadante a cada vez, em cilindro graduado. O volume final deve ser de 30 mL. Caso necessário, complete o volume com NaOH 1 N. Combine este sobrenadante com aquele do passo E.
- G. Use 1,0 mL, ou outra alíquota apropriada (vide as seções de preparo para a análise) para conduzir o método de determinação escolhido. Se for usar o método de Bradford, as amostras, que estão básicas devido ao NaOH, têm de ser neutralizadas com HCl, antes da análise, para não interferir com o reagente.

8.2.2. Método do Álcool a Quente

- A. Corte, aproximadamente, 1 g de amostra fresca (anote o peso) em pequenos pedaços.
- B. Submeta o material à extração em 10-20 mL de etanol 80% (v/v) fervente, por 10 min.
- C. Deixe esfriar e descarte o álcool.
- D. Macere o material com 20 mL de etanol 80% (v/v), em gral de porcelana. Remova o etanol por centrifugação (500 x g em temperatura ambiente, por 5 min) e extraia o resíduo com 20 mL de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) três vezes, em banho-maria a 50°C, durante um período máximo de 30 min, para remover os lipídios.
- E. Retire a solução clorofórmio-metanol por centrifugação (1.000 x g em temperatura ambiente, por 5 min), após cada extração.
- F. Solubilize as proteínas com 5 mL de NaOH 0,1 N em temperatura ambiente, durante 5 min, por duas vezes. Em cada uma delas, centrifugue a amostra (500 x g em temperatura ambiente, por 5 min) e recolha o sobrenadante.
- G. Anote o volume dos sobrenadantes combinados e inicie a determinação do teor protéico.

8.3. Extração sem Interferência da Clorofila

- Este procedimento é uma adaptação do método proposto por Eze & Dumbroff (1982):
- A. Adicione 10 mL de NaOH 0,1 M a 50 mg de tecido desidratado e moído. Deixe extrair por 12 h. Lave, opcionalmente, a amostra com acetona 80% (v/v), para remover os pigmentos, antes de iniciar a extração (para aumentar o rendimento).
 - B. Centrifugue o material (2.000 x g em temperatura ambiente, por 20 min) e colete o sobrenadante.
 - C. Adicione 10 mL de NaOH 0,1 M ao sedimento e deixe extrair por 3 h. Centrifugue a amostra como no item anterior e colete o sobrenadante.
 - D. Combine os sobrenadantes das extrações de 12 e 3 h e misture com 20 mL de TCA 10% (v/v) a 2°C.
 - E. Deixe a mistura repousar por 12 h. Centrifugue o material (1.000 x g em temperatura ambiente, por 15 min), para sedimentar as proteínas precipitadas pelo TCA.
 - F. Dissolva o extrato em NaOH 0,1 M e faça a determinação pelo método de Lowry (700 nm) ou Bradford (595 nm). Prepare a curva padrão com BSA ou BGG.

8.4. Extração Para Análise Direta

- A. Macere cerca de 1 g de tecido fresco a 4°C (ou seja, em banho de gelo) em gral de porcelana contendo 10 mL de tampão fosfato ou Tris 0,1 N (pH 6,8).
- B. Centrifugue o extrato (1.000 x g em temperatura ambiente, por 10 min) e colete o sobrenadante.
- C. Trate o sedimento uma vez mais com tampão e centrifugue, coletando o sobrenadante.
- D. Combine os sobrenadantes, anote o volume final e inicie a determinação.

OBSERVAÇÃO

- Quando se analisa uma solução protéica pela primeira vez, nem sempre se consegue atingir a amplitude adequada para o método colorimétrico. Uma saída é usar três concentrações diferentes da solução protéica. Como exemplo, pode-se usar: o extrato sem diluição, uma amostra diluída quatro vezes e outra dez vezes.
- Com esse artifício, é mais provável que se atinja a amplitude de absorbância do método colorimétrico do que a utilização de três ou mais repetições da mesma concentração. **Lembre-se de que a diluição é feita com NaOH 0,1 N.**

8.5. Determinação pelo Método de Lowry

- Essa técnica é uma modificação de Peterson (1979) para o método de Lowry et al. (1951).

8.5.1. Procedimento

- A. Prepare cinco tubos com as proporções do padrão de proteína (BSA, a 0,5 mg.mL⁻¹ NaOH 1N), mostrados na tabela 2, e faça a leitura no espectrofotômetro a 750 nm, começando pelo padrão de menor concentração.

OBSERVAÇÃO

- O padrão sugerido para o método de Lowry é na realidade soro humano, diluído de 100 a 1.000 vezes. Alguns têm relatado o fato de que soluções diluídas de BSA tendem a sofrer desnaturação de superfície, sendo portanto, padrões pobres. Apesar disso, a BSA é o padrão mais utilizado.
- No método de Lowry, as leituras são feitas a 750 nm para baixas concentrações de proteínas na amostra. Para soluções mais concentradas, as leituras podem ser feitas em outros comprimentos de onda, tais como 660 ou 500 nm.

- B. Coloque cada um dos padrões de proteína e o branco em tubos de ensaio de 10 mL, para obter as misturas do passo anterior. Alinhe os tubos em um suporte, de maneira que os reagentes possam ser adicionados em seqüência. Agite o tubo após cada adição.

TABELA 2. Volumes de padrão (0,5 mg de BSA.mL⁻¹ NaOH 1 N), respectivas quantidades de proteína e exemplos de leitura da D.O., para o método de Lowry.

Tubo N ^o	Volume de Padrão	NaOH 0,1 N	Proteína (µg.mL ⁻¹)	D.O. a 750 nm
1	1,0 mL	0,0	50	0,99
2	0,8 mL	0,2 mL	40	0,86
3	0,5 mL	0,5 mL	25	0,60
4	0,3 mL	0,7 mL	15	0,41
5	0,1 mL	0,9 mL	5	0,18
Branco	-	1,0 mL	-	0,00

Exemplos de D.O. obtidas em laboratório.

- C. Adicione 6 mL de tartarato cúprico alcalino. Mexa e agite imediatamente. Faça a série completa de tubos em ordem e em rápida sucessão. Após fazer a última adição, espere por 10 min. **Atue com rapidez, pois o reagente só é efetivo por um curto período de tempo.**
- D. Adicione 0,6 mL do reagente de Folin e misture. Tente ser o mais constante possível nesse procedimento. Um misturador *vortex* poderá ser utilizado. Deixe em repouso por 30 min.
- E. Determine a absorbância a 750 nm, contra o branco contendo todos os reagentes utilizados, menos a proteína. **Lembre-se de que a coloração desaparece após 1 h.**
- F. Faça a curva padrão, tendo as leituras da D.O. como função da concentração de proteínas no padrão. Normalmente, a curva padrão é composta de duas porções lineares. Provavelmente, uma curva será observada entre 120 e 200 µg de proteína. Uma regressão poderá ser feita, desde que a amplitude esteja em uma das porções lineares.
- G. Faça, a seguir, as determinações, utilizando suas amostras no lugar do padrão de BSA. Faça a leitura a 750 nm e obtenha, a partir da D.O. de cada amostra, o respectivo valor de concentração de proteínas na curva padrão ou na equação de regressão da calculadora.

8.5.2. Reagentes

A. Carbonato de sódio 2% (p/v) em NaOH 0,1N	Adicione 20 mg de Na ₂ CO ₃ e 4 mg de NaOH para cada litro de solução. Mantenha a solução bem fechada em garrafa tapada com rolha de borracha (não use tampa de vidro).
B. Solução de tartarato de sódio e potássio 2% (p/v)	Prepare semanalmente e mantenha a 4°C.
C. CuSO ₄ .5H ₂ O a 1% (p/v)	
D. Reagente Folin-Ciocalteu 1 N	Este reagente (disponível comercialmente) é uma mistura de ácido fosfotungstênico com fosfomolibdico. Caso necessário, o reagente pode ser diluído para 1 N pouco antes de ser utilizado. A normalidade da solução-estoque pode ser determinada pela titulação de fenoltaleína com padrão de NaOH.
E. Tartarato cúprico alcalino	Essa mistura deve ser preparada pouco antes de ser utilizada, através da mistura dos reagentes A, B e C, na ordem, e nas seguintes proporções a) 60 mL de A.; b) 0,6 mL de B.; e c) 0,6 mL de C.

8.6. Determinação pelo Método do Biureto

- Este método foi proposto por Gornall et al. (1949).
- A. Prepare uma curva padrão ou equação de regressão na calculadora, utilizando o reagente de Biureto. O estoque do padrão deve ser de 5 mg BSA.mL⁻¹ NaOH 1 N.
- B. Prepare seis tubos com as concentrações de BSA apresentadas na tabela 3.

TABELA 3. Volumes de padrão (0,5 mg de BSA.mL⁻¹ NaOH 1 N), respectivas quantidades de proteína e exemplos de leitura da D.O., para o método do Biureto.

Tubo	Volume de Padrão	NaOH 0,1 N	Proteína (µg.mL ⁻¹)	D.O. ^a a 555 nm
1	1,0 mL	0,0 mL	50	0,52
2	0,75 mL	0,25 mL	37,5	0,37
3	0,50 mL	0,50 mL	25	0,25
4	0,45 mL	0,55 mL	22,5	0,22
5	0,25 mL	0,75 mL	12,5	0,11
6	0,1 mL	0,9 mL	5	0,03
Branco	0,0 mL	1,0 mL	0,0	0,00

^a Exemplo de resultados obtidos em laboratório.

- C. Adicione 1,5 mL do reagente Biureto a 1,0 mL de amostra de proteína.
- D. Misture e deixe repousar por 30 min em temperatura ambiente. Faça então a leitura da D.O. a 555 nm.
- E. Faça o gráfico de leituras de D.O. x concentração de proteína. O branco é composto de reagente de Biureto e NaOH 0.1 N.
- F. Para a leitura das amostras, use alíquota de 1,0 mL, faça a leitura e obtenha o valor a partir da curva padrão ou regressão na calculadora.
- G. Prepare o reagente de Biureto da seguinte forma:
 - a) Dissolva 9 mg de tartarato de sódio e potássio em 400 mL de NaOH 0.2 N.
 - b) Adicione, em seguida, 3 mg de CuSO₄ 5H₂O em pó bem fino e deixe dissolver.
 - c) Por último, adicione 5,0 mg de iodeto de potássio (KI) e traga o volume para 1 L, com NaOH 0.2 N livre de CO₂.

8.7. Determinação pelo Método de Bradford (1976)

8.7.1. Preparo do Reagente

- A. Dilua uma parte do corante (azul de Coomassie) concentrado em quatro partes de água.
- B. Filtre em papel tipo Whatman N^o 1 e armazene em temperatura ambiente.
- C. Descarte a solução após duas semanas.

CUIDADOS

- O corante concentrado contém ácido fosfórico e metanol, devendo ser manuseado com cuidado.

8.7.2. Preparo da Curva Padrão

- A. Prepare padrões de proteína, variando de 0,2 a 1,0 mg de BSA.mL⁻¹ de água destilada.
- B. Transfira 0,1 mL de cada uma das concentrações do padrão para diferentes tubos de ensaio.
- C. Dispense 5,0 mL da solução diluída de azul de Coomassie em cada tubo.
- D. Agite ou aplique *vortex*, evitando formação excessiva de espuma.
- E. Espere de 5 a 60 min e faça a leitura dos padrões, contra o branco apropriado, a 595 nm.
- F. Faça o gráfico (ou regressão na calculadora) da D.O. em função de µg de proteínas.

8.8. Determinação Pelo Método de Bradford Modificado

- Apesar de sua rapidez e simplicidade, o método de Bradford tem sido criticado pela sua dependência, em termos de sensibilidade, à natureza da proteína usada como padrão (Van Wilgenburg et al., 1981). Visando resolver esse problema, Appenroth & Augsten (1987) apresentaram esta modificação.
- A. Dissolva 60 mg de corante *Acid Blue* (disponível comercialmente; corresponde a 100 mg de azul de Coomassie) em 50 mL de etanol absoluto, com agitação por várias horas. A agitação deve ser vigorosa, porém sem formação de espuma.
 - B. Filtre a solução, com **exatamente** 100 mL de H₃PO₃ 85% (p/p). Adicione 1 L de água.
 - C. Deixe repousar até o dia seguinte. Então, ajuste a concentração do corante para uma absorvância de 0,30 a 550 nm (eixo ótico 0,5 cm; concentração final = 0,005 %).
 - D. Adicione 1 mL de solução de SDS 3,003% (p/v) a 1.000 mL da solução do corante (concentração final do SDS = 0,003 %, p/v).
 - E. Misture 1 mL de solução de proteína com 2 mL desse reagente (passo D.).
 - F. Faça a leitura (595 nm) em cubeta de vidro, contra um branco contendo água, após 10-60 min. Cada amostra deve ter, pelo menos, três repetições.
 - G. Faça a curva padrão, ou equação de regressão na calculadora, com a absorvância (conjugação do corante) em função de concentrações conhecidas de BSA.

OBSERVAÇÃO

- Por não depender da natureza da proteína padrão, este método permite que se faça a hidrólise das proteínas com HCl 6 M e análise quantitativa de aminoácidos, pela soma da quantidade total de resíduos de aminoácidos.

8.9. Estudos de Interferência

- Os métodos de Lowry, Biureto e Bradford estão sujeitos à interferência por uma variedade de reagentes comuns (vide exemplos na tabela 4). A correção é normalmente feita usando brancos apropriados.
- Para estudar o problema, faça o seguinte ensaio: reaja 1 mL de tampão Tris 0,1 N pH 6,8 com os reagentes usados no método de Lowry e compare com um branco de NaOH 0,1 N.

8.10. Considerações Sobre os Métodos de Determinação

- O Biureto é cerca de 100 vezes menos sensível do que o Lowry.
- O Lowry é mais dependente no tipo de proteína utilizada no padrão.
- Ambos os métodos estão sujeitos à interferência por diversas substâncias, causando variação entre determinações.
- Íons amoniacaís causam interferência na reação do Biureto e o NaOH pode não neutralizar todo o sulfato de amônio.
- A reação do cobre alcalino e a reação de Biureto não são estritamente proporcionais. Também, para diferentes proteínas, a intensidade de cor do Biureto não é diretamente proporcional ao incremento de coloração causado pelo cobre na reação com o reagente de Folin. Com o Folin, uma quantidade muito pequena de cobre é suficiente para proporcionar quase que a coloração final, enquanto, no Biureto, as constantes de dissociação da reação $\text{cobre} + \text{proteína} \leftrightarrow \text{cobre} - \text{proteína}$ são, em geral, dez vezes maiores do que na reação do Folin.
- Eze & Dumbroff (1982) compararam os métodos de Bradford e Lowry. Verificaram que a adição de clorofila aos padrões protéicos comprometeu a precisão de ambas as técnicas, causando aumentos de 20 % (Bradford) e de 400 % (Lowry). A precipitação de proteínas com TCA eliminou a interferência da clorofila. Melhor resultado foi obtido tratando o tecido com acetona, antes da extração com o TCA.
- Uma vez removida a interferência, ambos os métodos são confiáveis. O Bradford é mais rápido, simples e sensível, mas o Lowry propicia maior linearidade sob altas concentrações de proteína e maior estabilidade da coloração desenvolvida.

TABELA 4. Substâncias que interferem nos métodos de Lowry e de Bradford.

Substância	Lowry	Bradford
EDTA	sim	não
Glicerol	sim	não
K ⁺	sim	não
BME	sim	não
Mg ⁺⁺	sim	não
NaOH 0,1 N	não	sim
Sacarose	sim	não
Tampão HEPES	sim	não
Tampão Tris	sim	não
Triton X-100	não	sim

8.11. Referências Bibliográficas

- APPENROTH, K.J.; AUGSTEN, H. An improvement of the protein determination in plant tissues with the dye-binding method according to Bradford. **Biochemie Physiologie Pflanzen**, Jena, v. 182, p.85-89, 1987.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.

- EZE, J.M.O.; DUMBROFF, E.B. A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein in chlorophyllous tissue. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.60, p.1046-1049, 1982.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.177, p.751-766, 1949.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- PETERSON, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.100, p.201-220, 1979.
- VAN WILGENBURG, M.C.M.; WERKMAN, E.M.A.; VAN CORKOM, W.H.; SOONS, J.B.J. Criticism of the use of Coomassie brilliant blue G-250 for the quantitative determination of proteins. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin, v.19, p.301-304, 1981.

9. AMINOÁCIDOS - ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA

CUIDADOS

- Conforme a espécie em estudo, pode ser que o extrato de aminoácidos tenha de ser diluído.

9.1. Introdução

A separação e estimativa do teor de aminoácidos, a partir de extratos diretos ou de hidrolisados de proteínas, são muito utilizadas na pesquisa fisiológica. Por exemplo, a reação de órgãos da planta ao ferimento ou estresse provoca a síntese de proteínas, podendo então ser caracterizada pela composição dos aminoácidos produzidos.

Existe uma grande diversidade de métodos na literatura para a determinação de aminoácidos, com variados graus de especificidade, e o leitor deve consultar artigos especializados, caso necessite conduzir estudos minuciosos. Todavia, os fundamentos da maioria das abordagens ainda são os mesmos utilizados originalmente, no final da década de 40.

No presente capítulo, a análise quantitativa e qualitativa de aminoácidos é apresentada, com base nas abordagens mais simples encontradas em diversos relatos. Apesar de alguns autores escolherem a modificação proposta por Rosen (1957), o método quantitativo de Moore & Stein (1948) é descrito, dada sua grande utilização. As análises qualitativas são, geralmente, conduzidas por meio de separações cromatográficas bidimensionais, tanto em papel quanto em camada fina (celulose, sílica gel G ou misturas de ambas). A cromatografia de papel é mais conveniente, pela maior facilidade de preparo, possibilidade de aplicação direta dos extratos alcoólicos vegetais no papel e insensibilidade aos sais e açúcares presentes no extrato, sendo, portanto, o método aqui descrito.

9.2. Extração de Aminoácidos

9.2.1. Etanol 80% (v/v)

- A. Triture 2 g MV em gral de porcelana, na presença de etanol 80 % (v/v) a 4°C e 0,5 g de areia quartzosa, durante cerca de 5 min.
- B. Faça duas extrações do homogeneizado com etanol 80% (v/v) a 80°C. Espere a suspensão esfriar.
- C. Adicione 1 volume de clorofórmio e 0,5 volume de água destilada, para remoção dos pigmentos.
- D. Centrifugue a mistura 1.000 x g em temperatura ambiente, por 15 min. A camada de clorofórmio, com os pigmentos, estará no fundo do tubo; a fração de etanol com os aminoácidos estará no topo. Conserve a camada de aminoácidos e descarte a de clorofórmio.
- E. Complete o volume da camada de aminoácidos para um valor conhecido. Tome uma alíquota de 1 mL para conduzir as análises.

9.2.2. Metanol-Clorofórmio-Água (MCA)

- Vários autores inferem que a extração com solução MCA (12 x metanol, 5 x clorofórmio e 3 x água destilada) é mais eficiente do que o etanol, apesar de ser mais trabalhosa.

- A. Triture 2 g de MV em gral de porcelana, na presença de 20 mL de MCA a 4°C e 0,5 g de areia quartzosa, durante cerca de 5 min.
- B. Centrifugue o homogeneizado (1.000 x g em temperatura ambiente, por 15 min) e colete o sobrenadante. Conserve o sedimento.
- C. Faça a extração do sedimento com MCA, repetindo o passo A. Homogeneize o material com o pilão de porcelana, a medida que fizer a extração.
- D. Centrifugue o homogeneizado, repetindo o passo B. Combine o sobrenadante obtido com aquele obtido no passo B. Descarte o sedimento.
- E. Adicione 1 volume de clorofórmio ao extrato, misture-o, e então adicione 1 volume de água. A mistura resultante será bifásica.
- F. Centrifugue a mistura a 1.000 x g em temperatura ambiente, por 5 min (opcionalmente, use funil de separação).
- G. Descarte a camada do fundo (clorofórmio) e conserve a camada aquosa.
- H. Reduza o volume do extrato, utilizando vácuo a 35°C. Anote o volume final (aproximadamente, 10 mL).
- I. Tome uma alíquota de 1 mL para as análises.

9.2.3. Água

- Recentemente, De Jong & Wolswinkei (1995) testaram a seguinte extração com água (epiderme de sementes de *Pisum sativum* L.) e obtiveram resultados similares ao uso de etanol 80% (v/v) a 80°C, em três períodos consecutivos de 1 h:
 - A. Coloque uma epiderme de semente de ervilha em 1 mL de água destilada e agite em banho-maria com movimento vaivém, a 100°C, por 20 min. Faça três extrações consecutivas.
 - B. Colete o extrato e adicione nova quantidade de água.
 - C. Combine os três extratos, anote o volume e armazene a -20°C, até a análise.

9.3. Determinação Quantitativa

9.3.1. Procedimento

- A. Misture a alíquota de 1 mL da amostra a 2 mL do reagente de ninidrina.
- B. Tape os tubos e agite, manualmente, até obter a mistura.
- C. Aqueça os tubos de ensaio em banho-maria fervente, durante 15 min.
- D. Adicione 6 mL de solução etanol 50% (v/v) a cada tubo de ensaio. Misture e deixe esfriar.
- E. Agite os tubos outra vez, para oxidar a hidrindantina residual. Faça a leitura a 570 nm.
- F. Prepare o gráfico (ou regressão), tendo a absorbância a 570 nm como função da concentração de aminoácidos.
- G. Use a leucina (PM = 131) como padrão, a partir de solução-estoque 200 µg.mL⁻¹. Faça as diluições, obtendo uma série de concentrações (ex. 140, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 µg.mL⁻¹).

9.3.2. Reagentes

A. Hidrindantina	Dissolva 8 g de ninidrina em 200 mL de água a 90°C. Ato contínuo, dissolva 8 g de ácido ascórbico em 40 mL de água, a 40°C. Coloque a solução de ninidrina sob agitação magnética e adicione a solução de ácido ascórbico. A cristalização da hidrindantina se inicia imediatamente. Sem mais aquecimento, deixe o processo ocorrer por 30 min. Deixe a solução esfriar. Filtre a hidrindantina e seque-a.
B. Tampão Acetato	Adicione 544 g de NaOAc.3H ₂ O ou 320 g de NaOAc anidro a 400 mL de H ₂ O. Após dissolução, adicione 100 mL de ácido acético glacial. Ajuste o pH e complete o volume, com água, para 1.000 mL.
C. Reagente de Ninidrina	Adicione 125 mL de tampão acetato 4 N pH 5,5 a 375 mL de éter monometílico de etilenoglicol, contendo 1 g de ninidrina e 150 mg de hidrindantina.

9.4. Determinação Qualitativa

- Preferencialmente, conduza cromatografia em papel, aplicando 1 mL como ponto de largada. Determine a duração da corrida, que é muito variável, de caso para caso.
- A solução de ninidrina 0,1 % (p/v) em acetona (preparada para uso imediato) é o reagente padrão a ser borrifado em papel ou placa de cromatografia, para revelação de aminoácidos.

- Prepare a solução de ninidrina contendo acetato de cádmio, para evitar o aquecimento do papel. Para isso, dissolva 1 g de ninidrina em mistura composta por 112 mL de acetato de cádmio aquoso (1 g de acetato de cádmio em 100 mL de água), 20 mL de ácido acético e 1.000 mL de acetona. O papel será mergulhado na solução, em vez de se usar borrifação.
- Faça a borrifação da solução de ninidrina no papel e aqueça-o a 105°C, por 10 min. A maioria dos aminoácidos se revelará em coloração roxa ou verde-azulada. A prolina e a hidroxiprolina serão reveladas por tons de amarelo.
- Coloque, opcionalmente, o papel em frasco fechado contendo H₂SO₄ e mantenha-o no escuro até o dia seguinte. Os aminoácidos serão revelados como manchas vermelhas em fundo branco.
- Aplique uma alíquota de 300 µL da amostra em papel-filtro tipo Whatman N^o 1 ou 3, de 30 x 40 cm, para revelar os aminoácidos remanescentes. Revele o cromatograma em duas dimensões, usando fenol-água (100 mg fenol/39 mL água) para a primeira direção e n-butanol-ácido acético-água (100:22:50 v/v/v) para a segunda direção.
- Seque o cromatograma e faça borrifação com reagente de ninidrina 0,2% (p/v) em n-butanol.
- Aqueça o papel em estufa a 80°C, por 10 min.
- Compare o cromatograma com o mapeamento padrão de Stepka (1973), para identificar os aminoácidos

- A identificação de aminoácidos no cromatograma de papel pode também ser feita com o indicador ninidrina-nitrato cúprico (N-NC), conforme segue:

- Prepare as seguintes soluções:

Solução A: 50 mL de ninidrina 0,2% (p/v) em etanol absoluto, 10 mL de ácido acético glacial e 2 mL de 2,4,6-colidina.

Solução B: solução de nitrato cúprico (trihidratado) 1% (p/v) em etanol.

- Combine 25 partes da solução A com 1,5 partes da solução B, imediatamente antes do uso.

- C. Faça borrifação do indicador N-NC sobre o papel, após as amostras terem secado. Coloque o papel em estufa a 105°C, por 2 min. Identifique os aminoácidos, conforme as colorações da tabela 5.
- D. Use marcadores de aminoácidos para comparar seus resultados.

TABELA 5. Cores identificadoras de aminoácidos em cromatogramas bidimensionais em papel.

AMINOÁCIDO	COR
Ácido Aspártico	Azul Claro
Ácido Glutâmico	Púrpura, enfraquecendo-se na Vertical
Alanina	Púrpura Escura
Arginina	Púrpura Escura
Asparagina	Dourada
Cisteína	Cinza Clara
Cistina	Cinza
Fenil Alanina	Amarela Esverdeada
Glicina	Marrom Alaranjada com Anel Laranja Brillhante
Histidina	Marrom Clara + Anel Marrom Escuro Dentro de Anel Amarelo
Isoleucina	Azul Clara
Leucina	Púrpura Clara com Anel Amarelo
Lisina	Marrom Avermelhada, formação de Anel Cor de Rosa na Vertical
Metionina	Púrpura Esverdeada com Anel Amarelo
Prolina	Verde Clara com Anel Amarelo
Serina	Marrom Esverdeada, formação de Anel Vermelho na Vertical
Tirosina	Marrom Clara
Treonina	Marrom Esverdeada, mudando para Marrom Púrpura na Vertical
Triptofano	Marrom com Anel Azul Brillhante
Valina	Púrpura

9.5. Referências Bibliográficas

- DE JONG, A.; WOLSWINKEI, P. Differences in release of endogenous sugars and amino acids from attached and detached seed coats of developing pea seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.94, p.78-86, 1995.
- MOORE, S.; STEIN, W. A modified Ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.176, p.367-372, 1948.
- ROSEN, H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.67, p.10-15, 1957.
- STEPKA, W. Identification of amino acids by paper chromatography. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. eds. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1973. v.3. p. 504-528.

10. CARBOIDRATOS - ANÁLISE QUANTITATIVA

CUIDADOS

- Use luvas e proteção ocular ao manipular o ácido sulfúrico.
- O ácido perclórico é explosivo. Trabalhe em capela à prova de explosão.
- O material liofilizado contém enzimas funcionais, devendo ser mantido a -20°C e seco.
- Antes de pesar a glicose para fazer os padrões, seque-a em estufa, de um dia para o outro, e deixe esfriar em dessecador. Aí então efetue a pesagem, o mais rápido possível, sem se ater a zerar os últimos algarismos do peso mostrado na balança. Para esse caso, o grau de desidratação da glicose é mais crucial do que a pesagem da exatíssima quantidade. Todavia, lembre-se de que o peso obtido tem de ser anotado. **Prepare cada solução-padrão imediatamente.**
- Geralmente, as leguminosas forrageiras bianuais e perenes (ex. alfafa e trevos) e as gramíneas tropicais e subtropicais são espécies acumuladoras de amido. As gramíneas de clima temperado (ex. aveia e cevada) são acumuladoras de frutanos.

10.1. Introdução

A determinação do nível de CNETs, por revelar a reserva prontamente disponível para o crescimento, tem aplicação em vários estudos fisiológicos. Em forrageiras, essa informação é a base para a avaliação do potencial de persistência. Todavia, existe uma grande variedade de carboidratos nas plantas e, devido a limitações pertinentes à extração e a diferenças na capacidade dos açúcares em reagir com os corantes utilizados, todo método tende a apresentar fontes de erro. Portanto, deve-se ter critério na condução dos procedimentos, para que haja reprodutibilidade dos dados. A literatura sobre o assunto é farta e maiores detalhamentos sobre o metabolismo de carboidratos em plantas são descritos por Duffus & Duffus (1984) e Dey & Dixon (1985).

Neste capítulo são apresentadas diferentes técnicas para três fases distintas do processo: secagem da amostra, extração e determinação do nível de CNETs. Qualquer combinação entre métodos de extração e de determinação é factível, observadas as particularidades. Esses procedimentos são relativamente simples e propiciam estimativas aceitáveis dos componentes hidrossolúveis dos carboidratos não estruturais. Em complementação, são apresentadas duas abordagens para maior rapidez, precisão, automação e fracionamento dos diferentes componentes dos carboidratos: extração e quantificação a partir de discos foliares, com leitura de microplacas, e separação através de HPLC.

10.2. Secagem e Moagem da Amostra Vegetal

- A extração em material verde requer rapidez e baixa temperatura, para minimizar a ação de enzimas endógenas. Por isso, o uso de tecidos secos e moídos (maior superfície específica) é preferível. Geralmente, o tecido é desidratado em estufa ou liofilizado (amostras pequenas) e moído na fineza desejada (geralmente, peneira de 1 mm).
- Mais recentemente, Marur & Sodek (1995) propuseram o uso do forno de microondas para a secagem de material vegetal, visando a análises bioquímicas.

10.3. Procedimentos Gerais para a Extração Química de Carboidratos Estruturais

OBSERVAÇÃO

- Constituintes de baixo PM, como os açúcares, podem ser removidos por extração exaustiva com etanol 80-90% (v/v). Em tecidos ricos em lipídios (ex. sementes), estes devem ser removidos com acetona, seguida por tratamento com éter-benzeno (1:1), antes de se extrair os açúcares.
- Polissacarídeos hidrossolúveis neutros, como os amidos e frutanos, podem ser extraídos com NaCl 1% (p/v), água fervente ou ácido perclórico a 35% (p/v). O ácido perclórico é mais eficiente, pela menor ocorrência de substâncias interferentes. Esses amidos podem ser recuperados da solução por meio da colocação dos extratos em diversos volumes de álcool, onde se precipitarão.

A. Pectinas

- Podem ser obtidas do resíduo das extrações descritas na **OBSERVAÇÃO** acima, por extração com solução de oxalato de amônio-ácido oxálico 0,5% (p/v) pH 4,0 a 90°C e, a seguir, precipitadas por acidificação e diluição em álcool (faça testes preliminares para determinar a concentração alcoólica ideal para seu tipo de amostra).

B. Lignina

- Pode ser removida, nesse estágio, com cloreto de sódio 1% (p/v) a 70°C, por 1 h. Se os tecidos forem ricos em lignina, a extração deve ser repetida várias vezes. Por outro lado, a lignina pode ser removida com *chloramine-T* e etanolamina. Esses extratos são descartados e o resíduo é lavado e secado.

C. Hemiceluloses

- Podem ser removidas do resíduo com NaOH ou KOH 7-12% (p/v), sob fluxo de N₂, à temperatura ambiente, por 24 h. Para que a extração seja total, o procedimento tem de ser repetido pelo menos duas vezes. A hemicelulose é removida pela acidificação dos extratos alcalinos com ácido acético e precipitação com etanol.

D. Celulose

- O resíduo final deve ser exaustivamente lavado e secado e constitui a fração pura de celulose. Pode ser extraída com H₂SO₄ 72% (p/v) a 4°C, por 24 h, ou refluxo com H₂SO₄ 80% (p/v), por cerca de 4 h.

OBSERVAÇÃO

- Em vários casos, as frações de polissacarídeos obtidas são separadas e purificadas por uma variedade de métodos, incluindo cromatografia de troca iônica.

10.4. Procedimentos Gerais para a Extração Química de Carboidratos Não-Estruturais

10.4.1. Extração de Açúcares Livres em Plantas Cultivadas no Escuro (Passos, 1989)

- A. Coloque as amostras (10 segmentos liofilizados de hipocótilo, com 5 mm de comprimento) em tubos de ensaio contendo 15 mL de etanol 80% (v/v), em temperatura ambiente, por 12 h.
- B. Coloque os tubos em banho-maria fervente, forçando a evaporação do etanol.
- C. Reduza as amostras ao menor volume líquido possível e, após esfriamento, ressuspensa-as em 15 mL de água destilada, para as determinações. Os pesos fresco e seco das amostras têm de ser conhecidos.

10.4.2. Extração Alcoólica de Açúcares

- A. Resfrie 1 g de material fresco em gelo e faça a maceração em gral de porcelana frio, contendo 20 mL de etanol 95% (v/v). Material seco moído pode também ser utilizado.
- B. Centrifugue o homogeneizado (centrífuga clínica, escala total, por 15 min).
- C. Submeta o sedimento à extração com 15 mL de etanol 80% (v/v) a 60°C. Aqueça o extrato em tubos de centrifugação, com água fervente (use a capela), até que o etanol comece a ferver. Centrifugue o material (centrífuga clínica, escala total, por 15 min) e retenha o sobrenadante.
- D. Combine os sobrenadantes dos passos B. e C.
- E. Purifique o extrato combinado, caso necessário, para remoção de clorofilas e lipídios. Para isso, adicione 1 volume de clorofórmio (15 mL), em funil de separação, e então água em volume apenas suficiente para obter duas camadas (20-30 mL). Faça agitação manual (gentilmente) do funil de separação. O clorofórmio com os pigmentos e lipídios se depositará no fundo.
- F. Registre o volume final da fase aquosa antes de estimar os açúcares.
- G. Retenha o sedimento para extrair amido, caso pertinente.
- H. Determine os açúcares livres pelo método da antrona, do fenol-H₂SO₄ ou de Teles.

10.4.3. Extração de Açúcares com Éter-Etanol

- A. Liofilize a amostra e faça a moagem (peneira de 1 mm).
- B. Faça a extração com éter, e, em seguida, com etanol 80% (v/v) aquecido. Faça testes preliminares para determinar os níveis ideais de volumes de éter e etanol, temperatura e duração de cada extração.
- C. Descarte o extrato do éter e complete o volume do extrato de etanol para um valor conhecido. A clorofila e os lipídios terão sido removidos.
- D. Remova os lipídios, opcionalmente, com acetona e, em seguida, solução éter-clorofórmio (1:1), antes de extrair os carboidratos com etanol. Esse caso se aplica a amostras com alto teor de lipídios. Faça testes preliminares para determinar a duração ideal das extrações.
- E. Retire uma alíquota para estimar o teor de açúcares no extrato aquoso.

10.4.4. Extração de Amido

- A. Seque o sedimento obtido na extração com etanol (item 10.4.2 ou 10.4.3.) rapidamente e faça a extração, por 15 min, com 10 mL de um dos seguintes solventes: (a) NaOH 0,5 N; (b) água fervente; (c) ácido perclórico 35% (p/v) (4,8 M) ou (d) NaCl 1% (p/v). O ácido perclórico é o melhor solvente de todos, mas tem de ser incluído nos padrões.
- B. Centrifugue o extrato (1.000 x g, temperatura ambiente, por 15 min) e retenha o sobrenadante.

- C. Registre o volume e use uma alíquota para medir o teor de amido pelo método da antrona, do fenol-H₂SO₄, ou de Teles, seguindo o método da curva padrão ou equação de regressão.

10.5. Extração Enzimática

10.5.1. Método de Smith (1981)

- A. Transfira 200 mg de amostra para um frasco *erlenmeyer* de 125 mL.
B. Adicione cerca de 15 mL de água destilada e aqueça em água fervente, evitando a formação de grumos. Faça duas amostras e um branco (contendo somente água).
C. Deixe a solução ferver levemente, durante 1-2 min, com agitações ocasionais, para gelatinizar os amidos.

OBSERVAÇÃO

- Açúcares simples podem ser removidos do material vegetal seco com etanol 80-95% (v/v) (conforme o item 10.4.2.), antes de gelatinizar os amidos.
- A quantidade de amido e açúcares pode ser determinada pela análise de uma alíquota de filtrado claro com o reagente de antrona ou fenol-H₂SO₄. O branco para o espectrofotômetro deve conter 1 mL de água e 5 mL do reagente de antrona, ou 0,5 mL de fenol e 2,5 mL de H₂SO₄.

- D. Esfrie até a temperatura ambiente, antes de adicionar a enzima.
E. Pipete 10 mL de tampão acetato e **exatamente** 10 mL da solução enzimática de α -amilase na solução no *erlenmeyer*. A enzima amiloglicosidade também pode ser utilizada.
F. Tape o *erlenmeyer* (com rolha de borracha) e incube a 38°C, por 24 h.
G. Faça agitação circular ocasional do *erlenmeyer*, para homogeneizar a mistura, caso parte da amostra fique aflorando na superfície da solução.
H. Filtre a solução em papel-filtro tipo Whatman N° 1, para balão volumétrico de 250 mL.
I. Lave o *erlenmeyer* e papel-filtro várias vezes, com cerca de 3 mL de água destilada.
J. Adicione 2 mL de acetato de chumbo neutro 10 % (p/v). Complete o volume com água destilada e misture bem.
K. Espere por 1 h, para que as proteínas se precipitem no fundo do balão volumétrico, antes de retirar uma alíquota para análise de poder redutor.
L. Analise uma alíquota da solução de carboidratos filtrada, usando o reagente de antrona, de fenol-H₂SO₄ ou de Teles.

CUIDADOS

- Embora a presença de chumbo não afete a titulação, ela é propensa a interferir no método colorimétrico.
- Use glicose como açúcar padrão.
- As α -amilases não hidrolizam frutanos. Se o tecido contém frutanos, é necessário hidrolizá-los com ácido, conforme procedimento no item 10.5.2.
- Se o tecido contém altos níveis de sacarose, hidrolize uma alíquota com ácido, para verificar se a enzima conseguiu converter toda a sacarose em monômeros.

10.5.2. Extração de Smith em Espécies Acumuladoras de Frutanos

- A. Pipete uma alíquota em tubo de ensaio 25 x 200 mm.
- B. Complete para 10 mL com água destilada.
- C. Adicione 1 mL de H₂SO₄ 1 N (ou 2 mL de H₂SO₄ 0,5 N).
- D. Cubra o tubo de ensaio com tampa plástica ou de vidro e misture exaustivamente.
- E. Aqueça em banho-maria fervente, por 15 min (20 min em altitudes elevadas).
- F. Esfrie e neutralize com 1 mL de NaOH 1 N (ou 2 mL de NaOH 0,5 N).
- G. Analise os carboidratos, usando frutose como açúcar-padrão.

10.5.3. Extração Enzimática de Teles (adaptada de Teles, 1977)

- A. Coloque 100 mg de amostra seca e moída (passada em peneira de 60 *mesh*), o padrão e o branco em três tubos de ensaio.
- B. Adicione 2 mL de tampão acetato 0,02 M (pH 4,9), tampe os tubos frouxamente e, imediatamente, autoclave por 15-20 min (115°C), ou ferva em água por 1 min. Este tratamento serve para inativar microrganismos e enzimas vegetais, assim como para facilitar futuro contato de enzima com o substrato.
- C. Esfrie para a temperatura ambiente por imersão em água corrente.
- D. Adicione exatamente 4 mL de solução enzimática 0,3% (p/v) e vede os tubos.
- E. Incube em banho-maria com agitação a 38-40°C, por 20-24 h.
- F. Retire as amostras do banho-maria e adicione exatamente 4 mL de água destilada.
- G. Agite o tubo imediata e vigorosamente, por 25-30 vezes, para extrair os açúcares.
- H. Centrifugue a 1.000 x g em temperatura ambiente, por 5 min.
- I. Deixe os tubos repousarem (mínimo de 5 e máximo de 60 min). O volume líquido final deve ser de 10 mL. A colorimetria deste método está descrita no item 10.7.3.

10.5.4. Reagentes para as Extrações Enzimáticas

A. Tampão Acetato	<ol style="list-style-type: none"> a) Misture dois volumes de ácido acético 0,2N com três volumes de acetato de sódio 0,2N. b) Ajuste o pH para 4,9 com NaOH ou HCl. c) Adicione 1-2 mL de solução de timol 10% (p/v), para prevenir o crescimento de microrganismos. Armazene em frascos escuros. d) Acetato de sódio 0,2N: dissolva 16,4 g de acetato de sódio anidro em água destilada e complete o volume para 1 L. e) Ácido acético 0,2N: dilua 12 mL de ácido acético glacial (99,5%, p/v) em água destilada e complete o volume para 1 L.
B. Solução Enzimática 0,5 % (p/v):	<ol style="list-style-type: none"> a) Adicione 5 g de α-amilase a 1 L de água destilada (0,5 g.100 mL⁻¹). b) Adicione 1-2 mL de solução de timol 10% (p/v). c) Filtre em papel-filtro tipo Whatman N^o 2 e armazene em frasco escuro, a 4°C. Preferencialmente, prepare a solução no dia do uso.
C. Acetato de Chumbo Neutro 10% (p/v)	Adicione 10g de acetato de chumbo neutro (PbOAc ₂ .3H ₂ O) a 100 mL de água destilada

10.6. Extração de Carboidratos Ácido-Digeríveis em Mandioca (Teles et al., 1979)

- A. Pese 500 mg de material seco e moído, em papel impermeável.
- B. Transfira a amostra, quantitativamente, para tubos de centrifugação de 50 mL, com tampa rosqueável.
- C. Extraia os carboidratos com 10 mL de etanol 50% (v/v) - volume completado com etanol - sob agitação mecânica, durante 60 min.
- D. Centrifugue a $5.000 \times g$, por 10 min, em temperatura ambiente.
- E. Transfira uma alíquota de 1 mL para tubo graduado de Folin-Wu de 25 mL.
- F. Adicione 1 mL de ácido clorídrico 0,6 N à alíquota, para digestão ácida dos dissacarídeos.
- G. Mantenha o tubo por 60 min em banho-maria a 90-100°C.
- H. Espere as amostras esfriarem e então adicione 2,5 mL do reagente de Teles (item 10.7.5.).
- I. Meça a D.O. a 520 nm (açúcares redutores).

10.7. Determinação do Nível de Carboidratos Não-Estruturais Totais

10.7.1. Reagente de Antrona (Morris 1948 e Yemm & Willis 1954)

10.7.1.1. Preparo do Reagente

- A. Adicione 0,1 g de antrona (**desidratada**) a 50 mL de ácido sulfúrico (adicione 45 mL do ácido concentrado a 5 mL de água, a seguir esfrie em gelo e misture - se o número de amostras for grande, adicione 450 mL de ácido a 50 mL de água).
- B. Deixe repousar por cerca de 30 min e agite, ocasionalmente, para clarificar.
- C. **Prepare a antrona fresca cada dia e use-a dentro de 12 h após a preparação.**

10.7.1.2. Preparo da Curva Padrão

- A. Prepare concentrações conhecidas de glicose, por meio da diluição da solução-estoque de glicose ($150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em água, de maneira a obter padrões com 0 (branco), 10, 20, 40, 60, 80 e $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Essas concentrações são sugestões, podendo ser alteradas, conforme as características das amostras e as particularidades do experimento.
- B. Pipete 1 mL de cada padrão de glicose em tubos de ensaio grandes e esfrie-os em gelo.
- C. Adicione 5 mL do reagente de antrona, misture bem e esfrie em gelo.
- D. Faça a mistura com o tubo ainda no gelo, visto que a adição de H_2SO_4 gera calor.
- E. Tampe os tubos (tampa plástica ou de vidro) e aqueça em água fervente, por 10 min.
- F. Esfrie em gelo e então transfira para temperatura ambiente e faça leitura a 625 nm.
- G. Prepare um gráfico, tendo a concentração dos padrões de glicose na abcissa e os valores da densidade ótica nas ordenadas; trace a reta que melhor se adapte aos pontos e verifique, para cada leitura de amostra, o valor da abcissa correspondente a leitura que foi feita. Essa será a estimativa da concentração de carboidratos (ou do composto que estiver sendo determinado).

- A concentração da amostra pode ser obtida, com maior precisão e rapidez, pelo seguinte procedimento para cálculo da equação de regressão linear em calculadora:

- A. Entre no módulo estatístico.
- B. Digite, na opção x,y , o dado de concentração do padrão de glicose como x e a respectiva densidade ótica como y .
- C. Proceda dessa forma com todos os dados e, após o último, peça o r , calcule o r^2 e verifique a sua significância (valores acima de 0,82, para correlação positiva, são aceitáveis).
- D. Obtenha a e b e entre com os valores de densidade ótica como x' , obtendo os valores y' , os quais representam os dados de concentração de carboidratos (ou do composto que estiver sendo determinado).

10.7.1.3. Determinação de Sacarose

- Esse método pode ser usado para determinar a concentração de sacarose em uma mistura de carboidratos, especialmente na presença de outros açúcares.
- A. Reduza o volume de cada amostra para, aproximadamente, 0,1 mL, sem no entanto atingir secagem total (cerca de 20-100 μg de sacarose), utilizando banho-maria fervente. **Soluções aquosas podem ser concentradas a 120°C e as alcoólicas a 100°C e, em seguida, a 120°C.**
 - B. Adicione 0,1 mL de KOH 30% (p/v) aquoso e mantenha a 100°C, por 10 min.
 - C. Espere os tubos esfriarem e adicione o reagente de antrona. Mantenha as amostras em chapa elétrica a 40°C, por 10-15 min.
 - D. Meça a D.O. a 620 nm. Use padrões de sacarose e branco que contenham 0,1 mL de água, 0,1 mL de KOH 30 % (p/v) e o reagente de antrona.

OBSERVAÇÃO

- A sensibilidade da antrona aos açúcares redutores é destruída por KOH quente, visto que ele destrói os açúcares redutores.
- Carboidratos que contém frutose produzem cor ao reagir com antrona fria.
- A antrona fria reage com a porção-frutose da sacarose na presença de ácido sulfúrico, visto que o H_2SO_4 quebra a sacarose.

10.7.2. Reagente Fenol- H_2SO_4

- Este reagente tem sido usado para testar e estimar açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos (método modificado de Dubois et al., 1956).
- A. Pipete 1 mL de solução que contenha uma concentração conhecida do açúcar (0 e 100 μg de açúcar) em um tubo de ensaio.
 - B. Adicione 0,5 mL de fenol 5% (v/v).
 - C. Adicione 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado, rapidamente. **Dirija o fluxo de ácido contra a superfície do líquido, em vez de contra a parede do tubo de ensaio, para obter uma boa mistura.** Deixe os tubos em repouso, por 10 min, agite-os e coloque-os em banho-maria a 25-30°C, por 10-20 min.
 - D. Efetue as leituras em temperatura ambiente. A coloração é estável por várias horas.
 - E. Leia a 490 nm para hexoses e a 480 nm para pentoses.
 - F. Use curva padrão, ou equação de regressão, conforme feito no item 10.7.1.2.

10.7.3. Reagente de Teles

- Esse procedimento deve ser usado em seqüência à extração feita no item 10.5.3.

10.7.3.1. Procedimento

- Transfira uma alíquota do líquido sobrenadante para um tubo de ensaio.
- Adicione 2,5 mL do reagente de Teles e feche firme com rolha de borracha seca.
- Imerse o fundo do tubo (4 a 6 cm) em banho-maria fervente por exatamente 6 min.
- Complete o volume até a marca de 12,5 ou 25 mL, dependendo do teor de CNETs.
- Leia a absorbância em espectrofotômetro a 520 nm, em cubeta de 10 mm. A cor é estável em temperatura ambiente por, no mínimo, 12 horas. Use a seguinte expressão:

$$\% \text{ CNETS} = \frac{(\text{absorbância da amostra}) \cdot (\text{peso do padrão de glicose})}{(\text{absorbância do padrão de glicose}) \cdot (\text{peso da amostra})} \times 100$$

- Use um padrão de glicose cuja absorbância seja próxima a da amostra, ou prepare uma curva padrão, ou faça regressão.

10.7.3.2. Reagentes

A. Padrões de Glicose	Prepare uma série de soluções que contenha de 26 a 60 mg de glicose (ou sacarose). mL ⁻¹ de água destilada. A inclusão da sacarose permite verificar a atividade da invertase.
B. Tampão Acetato	a) Solução-Estoque: Misture três volumes de acetato de sódio 0,2 M com dois volumes de ácido acético 0,2 M, ajuste o pH para 4,92 e armazene em frasco escuro, bem tampado, a 4°C. b) Solução de Trabalho: Adicione nove volumes de água destilada a um volume da solução-estoque e agite, para misturar. Esta solução (0,02 M) deve ser preparada imediatamente antes de cada análise.
C. Solução Enzimática	Prepare uma solução enzimática 0,3% (p/v) imediatamente antes de utilizá-la. Mantenha esta solução em mistura constante (agitador magnético), até o momento em que for transferi-la para os tubos.
D. Reagente de Teles	a) Soluções-Estoque (em água): Solução A: fenol 1% (p/v); Solução B: hidróxido de sódio 5% (p/v); Solução C: ácido pícrico 1% (p/v); e Solução D: bissulfito de sódio 1% (p/v) (use reagente com alto grau de pureza). As soluções A, B e C ficarão estáveis por, no mínimo, um mês e a D, por dois dias. b) Solução de Trabalho: Prepare a mistura, na seguinte ordem: um volume de fenol (A), dois volumes de hidróxido de sódio (B), dois volumes de ácido pícrico (C) e um volume de bissulfito de sódio recém-preparado (D). Mantenha o reagente em frasco escuro, bem tampado. Prepare a mistura no dia em que for usá-la.

10.8. Método de Extração e Análise de CNETs em Microplacas

- O uso de amostras em pó fino pode apresentar problemas, caso a secagem não seja bem feita.

- Além disso, o processo consome muito tempo, visto que o moinho tem de ser limpo entre moagens. Por último, algumas abordagens de detecção são, até certo ponto, não específicas, deixando alguma incerteza quanto ao que está sendo medido. Por isso, Hendrix (1993) sugeriu esse método de determinação rápida, que utiliza amostras frescas.

10.8.1. Coleta das Amostras

- A. Remova seis discos com $0,42 \text{ cm}^2$ de limbos foliares expandidos, em padrão sistemático, próximo à margem e excluindo a nervura central.
- B. Transfira, rapidamente, cada amostra de seis discos para tubos de ensaio de polipropileno 13 x 100 mm selados, com 2 mL de etanol 80% (v/v) resfriado em gelo.
- C. Transporte os tubos para o laboratório em caixa de isopor e armazene-os a -19°C até a análise.
- D. Colete plantas inteiras, para amostragem da raiz principal, e submeta-as à secagem, até obtenção de peso uniforme em todas as amostras.
- E. Remova pequenos pedaços das raízes principais e as seccione radialmente a intervalos de $200\mu\text{m}$, utilizando um micrótomo manual. Pese essas amostras e as analise para amido, usando o mesmo procedimento relativo à parte aérea.

10.8.2. Extração

- A. Submeta os tubos com discos foliares a um banho-maria a 80°C , por 15 min. Para os tubos com raízes, deixe por 30 min.
- B. Decante o etanol dos tubos e coloque 2 mL de etanol 80% (v/v) e faça de novo a incubação a 80°C . Repita o procedimento por mais uma vez, ou até que toda a coloração verde das folhas tenha sido removida dos discos.
- C. Transfira o etanol, quantitativamente, para frascos volumétricos de 10 mL, após cada extração.
- D. Complete o volume com etanol e misture por inversão.
- E. Remova 1,5 mL de cada frasco volumétrico e separe para análises posteriores de glicose, frutose e sacarose.
- F. Misture as alíquotas com 20 mg de carvão ativado fino (partículas de 38-150 μm) em tubo de microfiltro para centrifugação, para analisá-las quanto à hexose e à sacarose. Faça agitação manual (leve) dos tubos e submeta-os à centrifugação ($2.200 \times g$ em temperatura ambiente, por 15 min), para produzir um extrato alcoólico translúcido.

OBSERVAÇÃO

- A purificação com carvão é essencial para a remoção de substâncias solúveis em etanol e que interferem com a subsequente reação colorimétrica dos extratos enzimáticos.

- G. Transfira, para analisar os açúcares, pequenas alíquotas para poços de microplacas e submeta-as à secagem em estufa, a 55°C . Assim, amostras diluídas podem ser rapidamente concentradas antes da análise, caso necessário.
- H. Aplique, em seguida à evaporação do etanol, 20 μL de água destilada a cada poço com amostra.
- I. Prepare também séries de poços, na mesma microplaca, com 0,1 a 2,5 μg cada um, de glicose, frutose e sacarose, que serão os padrões.
- J. Use a primeira fileira da microplaca para conter água destilada em quantidade suficiente para zerar a leitora de microplacas a 492 nm.

10.8.3. Análise de Açúcares nas Microplacas

- A. Empregue, para a detecção de glicose, uma mistura (disponível comercialmente) que contenha glicose-6-fosfato desidrogenase, hexoquinase, metassulfato de fenazina, ATP, NADP⁺, violeta de iodonitrotetrazólio e tampão, reconstituída com água destilada, conforme as instruções do fornecedor. Visto que esta mistura é sensível à luminosidade, conduza todas as operações com as microplacas, a partir deste ponto, sob luz opaca.
- B. Adicione 100 µL dessa mistura a cada poço da microplaca. Em seguida, cubra cada placa com lâmina de alumínio, para excluir a penetração de luz, incubando-as em estufa a 33°C, por 15 min.
- C. Determine a D.O. de cada poço, a 492 nm, em uma leitora de microplacas.

CUIDADOS

- Durante a aplicação de soluções nos poços das microplacas, não aplique a última gota de solução da micropipeta, procedimento que é a principal causa de formação de bolhas. Os efeitos da falta dessa gota nos resultados finais são desprezíveis.
- Evite agitar as microplacas agressivamente, pois também haverá formação de bolhas. Para misturar os conteúdos nos poços, dê apenas leves toques com a ponta do indicador nas laterais das microplacas.
- A mistura usada no passo A. produz coloração somente com *D*-glicose-6-fosfato. Portanto, ela detecta somente a glicose extraída pelo etanol, nas amostras em que foi convertida para glicose-6-fosfato, pela hexoquinase.

- D. Faça uma curva de absorbância (ou faça regressão) a partir das leituras feitas nos poços que contêm os padrões. Esta será então usada para determinar os teores das amostras, conforme a leitura feita. Espera-se uma curva padrão altamente linear (valor de r^2 em torno de 0,98).
- E. Determine o teor de frutose nos extratos alcoólicos, observando o seguinte procedimento: meça primeiro a absorbância para glicose e, após, adicione 10 µL de solução de fosfoglicose isomerase a cada poço. Esta converterá a frutose-6-fosfato criada pela hexoquinase em glicose-6-fosfato.
- F. Prepare a solução de fosfoglicose isomerase adicionando 1,0 mL de HEPES 0,2 M pH 7,8 a um frasco com 1.000 UA da enzima.
- G. Adicione a solução enzimática nos poços da microplaca. Ato contínuo, misture as soluções gentilmente (por batidas leves com a ponta do indicador na lateral da microplaca) e coloque-as sob incubação no escuro a 37°C, por 15 min. Em seguida, faça a leitura a 492 nm. Os valores de absorbância dessa segunda leitura serão proporcionais ao teor de hexose (ou seja, glicose + frutose) da amostra. A diferença entre as duas leituras será proporcional ao teor de frutose da amostra.
- H. Adicione 83 UA de invertase a cada poço com a solução de fosfoglicose isomerase, faça nova incubação (conforme o passo G.) e releia a 492 nm, para obter uma absorbância proporcional ao teor conjunto de sacarose e hexose em cada poço. A partir deste valor, o teor de sacarose será obtido por subtração.
- I. Prepare a solução de invertase, adicionando 50 mg de preparado de invertase em pó (estoque com 825 UA.mg⁻¹) a 5 mL de tampão citrato 0,1 M pH 6,0.

10.8.4. Análise de Amido

- A. Adicione 1 mL de KOH 1 M a cada tubo com amostras em que os açúcares solúveis em etanol foram removidos (item 10.8.2., passo F.) e coloque-os em banho-maria fervente, por 1 h, para gelatinizar o amido.

OBSERVAÇÃO

- Tubos de ensaio de polipropileno são muito melhores para essa finalidade do que os de vidro, porque propiciam uma ebulição menos agitada.
- Os tubos de ensaio ficarão descobertos durante o tratamento de banho-maria fervente. Portanto, ajuste o nível da água no banho-maria para que ela não contamine os tubos.

- B. Retire os tubos do banho-maria e deixe-os esfriar. Neutralize a alcalinidade da amostra, com 0,2 mL de ácido acético 1,0 M. O pH das amostras deverá cair para 6,6-7,5.
- C. Coloque 200 µL de um preparado de α -amilase tolerante ao calor (proveniente de *Bacillus licheniformis*), com 360 UA, para hidrolisar o amido das amostras. Para isso, dilua a enzima dez vezes com tampão Tris-acetato pH 7,2 e submeta a solução à diálise contra água, em temperatura ambiente, até que o preparado teste negativo contra glicose.
- D. Coloque os tubos em banho-maria a 85°C, com agitação freqüente, por 3 min, após a adição da enzima. Mantenha em incubação por mais 27 min, com agitação ocasional.
- E. Retire os tubos do banho-maria, esfrie-os em temperatura ambiente e reduza o pH de cada tubo para 5,0, por adição de ácido acético.
- F. Adicione 1 mL de um preparado de amiloglicosidase, com 122 UA. Para isso, dilua a enzima cinco vezes com tampão acetato 50 mM pH 4,5 e submeta à diálise de um dia para o outro, contra diversas trocas do mesmo tampão, até que o preparado teste negativo contra glicose. Antes do uso, teste cada solução de amiloglicosidase para atividade de digestão de amido, por meio da determinação da quantidade de glicose que é liberada de quantidades conhecidas de amilopectina - uma digestão virtual quantitativa de amilopectina deverá ser obtida nesses testes.
- G. Complete a hidrólise do amido, colocando os tubos em banho-maria a 55°C, por 60 min.
- H. Paralise a digestão de amido, colocando os tubos em banho-maria fervente por 4 min.
- I. Complete o volume líquido de cada tubo para um valor conhecido (normalmente, 6 mL), misture os conteúdos e transfira uma alíquota para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL.
- J. Submeta os microtubos à centrifugação (3.000 x g em temperatura ambiente, por 10 min), para remover partículas.
- K. Pipete alíquotas de 20 µL nos poços da microplaca de 96 poços, para analisar a glicose.

10.9. Fracionamento por HPLC

- Este procedimento foi descrito por Thome et al. (1986).
- A. Prepare 300 mg de caule liofilizado e moído.
- B. Faça a extração com 50 mL de água, sob temperatura ambiente, por 1 h. Em seguida, ferva por 5 min e seque a amostra, utilizando vácuo.
- C. Remova os lipídios, em duas lavagens com 2 mL de clorofórmio e redissolva os CNETs em 3 mL de água.

- D. Precipite os compostos nitrogenados, aplicando 800 μL de ácido sulfossalicílico aquoso 2% (p/v). Filtre a amostra (0,45 μ).
- E. Separe os carboidratos, por pressão em resina de troca catiônica porosa e estável (com uma coluna suplementar interposta), nas seguintes condições: (a) Volume da amostra: 5 μL ; (b) Solvente: água bidestilada; (c) Taxa de fluxo: 0,2 mL.min⁻¹; (d) Pressão interna na coluna: 0,7 MPa; e (e) Temperatura na coluna: 50°C.
- F. Conecte um analisador automático de açúcares ao sistema (figura 5), para detecção contínua de carboidratos separados pela HPLC.
- G. Faça a medição colorimétrica dos carboidratos hidrolisados por meio da reação de açúcares monoméricos com o hexacianoferrato de potássio [K₂Fe(CN)₆] e leitura da absorbância a 425nm.

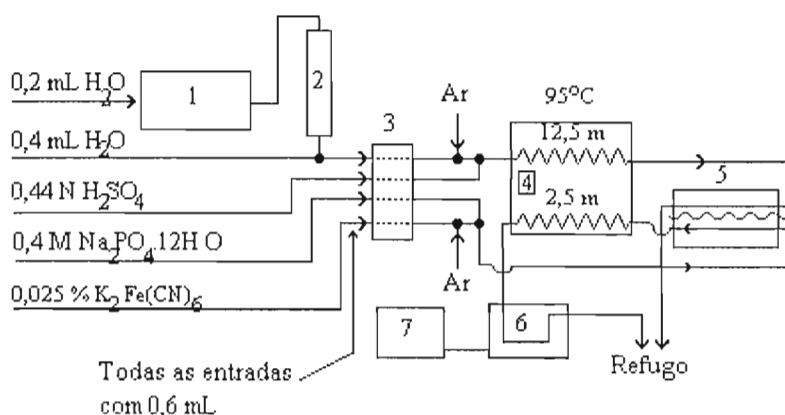


FIGURA 5. Esquema simplificado do fluxo da determinação automatizada de carboidratos hidrossolúveis, com base na HPLC, em que 1 = bomba da HPLC; 2 = coluna: a 50°C; 3 = sistema peristáltico, 4 = serpentina de reação; 5 = unidade de diálise; 6 = fotômetro; e 7 = registrador. Adaptado de Thome et al. (1986).

10.10. Referências Bibliográficas

- DEY, P.M.; DIXON, R.A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic Press, 1985. 378 p.
- DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.
- DUFFUS, C.F.; DUFFUS, J.H. **Carbohydrate metabolism in plants**. New York: Longman, 1984. 180 p.
- HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, Madison, v.33, p.1306-1311, 1993.

- MARUR, C.J.; SODEK, L. Microwave drying of plant material for biochemical analysis. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.7, p.111-114, 1995.
- MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**, Washington, v.107, p.254-255, 1948.
- PASSOS, L.P. **Growth and water status responses of mung bean (*Vigna mungo* L.) and other dicot species to osmotic stress**. Tucson: University of Arizona, 1989. 108 p. Dissertação de Doutorado.
- SMITH, D. Removing and analyzing total nonstructural carbohydrates from plant tissue. **Wisconsin Agriculture Experiment Station Research Report**, Madison, n.2.107, 1981. 13p.
- TELES, F.F.F.; OLIVEIRA, M. de; SILVEIRA, A.J. da; FABRIS, J.D.; BATISTA, C.M. Carboídratos solúveis, redutores e não redutores, de dez clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados em Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v.147, p.513-516, 1979.
- TELES, F.F.F. **The nutrient analysis of prickly pear**. Tucson: University of Arizona, 1977. 157 p. Dissertação de Doutorado.
- THOME, U.; HUBER-REINHARD, M.; KÜHBAUCH, W. Determination of the concentration and composition of water soluble carbohydrates in the vegetative plant parts of wheat based on HPLC. In: RANDALL, D.D.; MILES, C.D.; NELSON, C.J.; BLEVINS, D.G.; MIERNYK, J.A. eds. **Current topics in plant biochemistry and physiology**. v.5. Columbia: University of Missouri, 1986. p.184.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, Colchester, v.57, p.508-515, 1954.

11. EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS E ESTIMATIVA DO TEOR DE CLOROFILA

CUIDADOS

- Faça as extrações SEMPRE sob luz difusa (ou opaca), com as demais lâmpadas da área de trabalho apagadas, para minimizar alterações nos pigmentos.
- Sempre que possível, mantenha as soluções em vidros cobertos com material opaco (ex. folha de alumínio).
- Evite a inalação e o contato cutâneo com o metanol.

11.1. Introdução

Os tecidos verdes apresentam dois tipos de clorofila, os quais são muito similares e ocorrem em mistura, juntamente com outros pigmentos carotenóides: a clorofila *a* e a clorofila *b*. Um problema primário nos estudos de pigmentação é a determinação das concentrações de cada um deles. A literatura é vasta em métodos que abordam o assunto, em virtude da importância da clorofila para a FS, sua sensibilidade a vários processos metabólicos e as alterações que sofre, como parte das respostas da planta ao ambiente.

Existem diversos métodos para a determinação do teor total de clorofila em amostras secadas em forno e moídas em pó fino. Todavia, esse tipo de extração conduz a erro, devido às rápidas alterações nos pigmentos durante o processo de secagem, tendo, por isso, limitada aplicação. Em decorrência, o uso de discos foliares recém-destacados tem predominado. Como alternativa, o teor total *in situ* tem sido estimado por meio de medidores portáteis (disponíveis comercialmente) e utilizado como indicador do estado nutricional em nitrogênio (Piekielek et al. 1992, Schepers et al. 1992 e Piekielek et al. 1995).

A grande maioria dos métodos e equações disponíveis (os quais variam, mormente, em função da concentração de acetona usada para a extração) derivam do método clássico para a estimativa das clorofilas *a* e *b*, desenvolvido por Arnon (1949). Este método ainda é o de maior aceitação na atualidade (ex. Okada et al. 1992 e Marengo & Lopes 1994). Outro tipo de extração baseia-se no uso de metanol (Porra et al., 1989).

Os procedimentos descritos neste capítulo, tendo por base o método de Arnon, visam: (a) extrair e separar os principais pigmentos foliares, por meio de partição de solventes e cromatografia de papel ascendente; (b) determinar os espectros de absorbância dos pigmentos foliares combinados, ou separados; (c) determinar e comparar os teores de clor *a*, clor *b* e clorofila total de folhas; e (d) conduzir rápida determinação do teor total de clorofila.

11.2. Fundamento do Método de Arnon

Utilizando-se de dados precisos, Arnon demonstrou a existência das seguintes relações:

$$\text{I. } A_{663} = 82,04 \cdot \text{conc. clor a} + 9,27 \cdot \text{conc. clor b}$$

$$\text{II. } A_{645} = 16,75 \cdot \text{conc. clor a} + 45,6 \cdot \text{conc. clor b}$$

Os números 82,04, 9,27, 16,75 e 45,6 são coeficientes específicos de absorção ótica para a clor *a* e clor *b*, expressos em g.L^{-1} .

A equação II pode ser rearrajada para o seguinte termo:

$$\text{III. clor a} = A_{645} - 45,6 \text{ clor b} / 16,75$$

Substituindo esta expressão por clor a na equação I e resolvendo para clor b, temos:

$$\text{IV. } \boxed{\text{clor b (g.L}^{-1}\text{)} = 0,0229 \cdot A_{645} - 0,00468 \cdot A_{663}}$$

Substituindo esta expressão por clor b na equação I e resolvendo para clor a, temos:

$$\text{V. } \boxed{\text{clor a (g.L}^{-1}\text{)} = 0,0127 \cdot A_{663} - 0,00269 \cdot A_{645}}$$

$$\text{clor a} + \text{clor b} = 0,0127 \cdot A_{663} - 0,00468 \cdot A_{663} + 0,0229 \cdot A_{645} - 0,00269 \cdot A_{645}$$

$$\text{VI. } \boxed{\begin{array}{l} \text{clorofila total (g.L}^{-1}\text{)} = 0,0202 \cdot A_{645} + 0,00802 \cdot A_{663} \\ \text{clorofila total (mg.L}^{-1}\text{)} = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663} \end{array}}$$

11.3. Preparo das Soluções-Estoque de Pigmentos

11.3.1. Extrato em Acetona 80% (v/v)

- A. Corte a amostra em pequenos fragmentos.
- B. Pese 10 g e faça a homogeneização em liquidificador (copo de 250 mL), por cerca de 2 min, em 100 mL de acetona 80% (v/v) com cerca de 0,5 g de CaCO_3 ou MgCO_3 .

OBSERVAÇÃO

- Em algumas espécies, o vacúolo celular contém ácidos orgânicos que causam redução no pH e alterações nas clor a e b. Adiciona-se CaCO_3 ou MgCO_3 para prevenir esse efeito.

- C. Filtre o homogeneizado imediatamente, com papel-filtro tipo Whatman N°1, em funil de *Buchner*. Opcionalmente, use sistema de aspiração, fazendo a exaustão com o devido cuidado.
- D. Lave o copo do liquidificador com adicionais 50 mL de acetona 80% (v/v) e filtre, como no item A. Pode ser que novo papel-filtro seja necessário, à medida que o papel for ficando saturado com resíduos. Portanto, filtre o homogeneizado aos poucos, substituindo o papel-filtro conforme necessário.
- E. Combine os filtrados, misture e complete o volume para 150 mL, com acetona 80% (v/v). Se a solução com clorofila estiver leitosa, cubra o frasco com *Parafilm* e deixe no refrigerador por 1-2 h, antes de ler no espectrofotômetro. Faça três repetições.
- F. Meça a absorbância a 645, 652 e 663 nm. Calcule as concentrações de clor a e clor b, de acordo com as equações IV e V. Calcule o teor total de clorofila, usando a equação VI. Expresse os resultados em mg clorofila.g⁻¹ MV. Calcule os valores para a relação clor a/clor b.

11.3.2. Partição de Solventes

- A. Transfira 60 mL do extrato de acetona do item 11.3.1., passo F., para um funil de separação de 250 mL, o qual contenha 60 mL de éter de petróleo.

- B. Adicione 70 mL de água, derramando-a vagorosamente e fazendo com que desça pela superfície interna do funil.
- C. Tape o funil e gire-o levemente, até que a camada superior contenha a maior parte da clorofila.
- D. Deixe as camadas se separarem. A fração aquosa inferior conterá a maior parte da acetona, tendo os pigmentos sido transferidos para a camada de éter de petróleo. Portanto, drene esta fase aquosa e a descarte.
- E. Lave a fração de éter de petróleo duas vezes com porções de 25 mL de água, procedendo como no passo B, descartando, a cada vez, a fração aquosa.
- F. Adicione 50 mL de metanol 92% (v/v) à fração de pigmentos e misture bem.

OBSERVAÇÃO

- O metanol é polar o suficiente para dissolver a clor *a* e as xantofilas, mas a clor *b* e os carotenóides, por serem mais hidrofóbicos, permanecem na camada superior, apolar, de éter de petróleo.

- G. Colete cada uma das duas camadas em frascos diferentes.

11.4. Determinação dos Espectros de Absorção

OBSERVAÇÃO

- Lembre-se de que três soluções de pigmentos estão disponíveis: *pigmentos totais* em acetona 80% (v/v), *clor a e carotenos* em éter de petróleo e *clor b e xantofilas* em metanol 92% (v/v). Nos comprimentos de onda usados no método de Arnon (645 e 663 nm), não é raro obter-se leituras de absorbância muito elevadas (em torno de 0,9) com essas soluções, havendo necessidade de diluições. Esse procedimento, todavia, deve ser evitado em determinações baseadas na formação de cor, como é o caso da espectrofotometria.

- A. Dilua uma pequena alíquota de cada solução com o solvente apropriado, de maneira a obter uma absorbância entre 0,3 e 0,4, a 660 nm.
- B. Determine o espectro de absorção de cada solução, de 400 a 700 nm, utilizando intervalos de 10 nm. *Lembre-se de fazer o branco com o solvente apropriado para cada caso.*
- C. Prepare um gráfico para cada solução, colocando a D.O. como função do comprimento de onda (nm).

11.5. Cromatografia Ascendente em Papel

- Serão corridas três tiras de papel, uma para cada solução-estoque de pigmentos.
- A. Adicione a solução de cromatografia (acetona-éter de petróleo 1:1) ao tubo de ensaio que será usado como *recipiente de cromatografia*, até a altura de 1,5 cm.
- B. Tampe o tubo com rolha de borracha (firmemente) e coloque-o em um suporte, na posição vertical.

- C. Corte uma tira de papel-filtro no formato mostrado na figura 6, manuseando a tira somente pelas bordas.
- D. Apare a extremidade de baixo da tira, de maneira que a ponta formada fique pendurada 1 cm acima do fundo do tubo de ensaio.
- E. Introduza um pino com alça na rolha, no qual a extremidade de cima da tira de papel será encaixada.
- F. Aplique 10 μL de amostra na constrição da tira de papel. Quando a mancha secar, aplique de novo e seque. Repita esta seqüência de 8 a 10 vezes.
- G. Insira e encaixe a tira de papel no tubo, fechando-o firmemente.
- H. Deixe a migração ocorrer, até que o solvente atinja a alça do pino. Então, remova a tira e deixe secar.
- I. Fotografe ou marque as posições das manchas com um lápis, visto que certo grau de desvanecimento poderá ocorrer, com a exposição à luz.
- J. Identifique as manchas, considerando as polaridades relativas da clor a e da clor b.

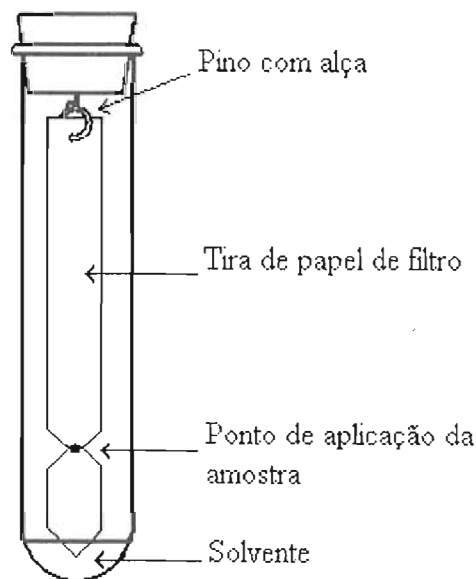


FIGURA 6. Esquema da cromatografia ascendente em papel para a detecção de pigmentos foliares.

11.6. Método para Rápida Estimativa da Clorofila Total

- Este método tem aplicação industrial e foi desenvolvido em *Mangifera indica* L., por Teles et al. (1977). Apresenta, como vantagens, a conveniência (4 h são liberadas para outras tarefas no laboratório) e simplicidade.
- A. Seque as amostras a 105^oC, por 3 h. Em seguida, reduza a amostra a pó fino, passando-a em peneira. Mantenha as amostras em dessecador de vidro âmbar, até as análises.
 - B. Prepare conjuntos de 10 amostras, cada uma com 500 mg, em tubos de 60 mL com tampa.
 - C. Adicione 30 mL de acetona 80% (v/v) a cada tubo. Deixe a extração ocorrer, no escuro, por 4 h.

- D. Filtre a amostra para um balão volumétrico de 250 mL. Complete o volume com acetona.
E. Dilua as soluções hialinas para 1:10 com acetona 80% (v/v). Coloque as amostras em cubetas de quartzo, quadradas, com 10 mm de caminho ótico e leia a absorbância a 642,5 e 660 nm.
F. Calcule o teor total de clorofila pela equação:

$$\text{Clorofila Total} = (9,68 \cdot E_{660} + 22,84 \cdot E_{642,5}) \text{ mg.L}^{-1}$$

11.7. Referências Bibliográficas

- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, p.1-15, 1949.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. Leaf chlorophyll concentration and nitrogen content in soybean plants treated with herbicides. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.6, p.7-13, 1994.
- OKADA, K.; INOUE, Y.; SATOH, K.; KATOH, S. Effects of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v. 33, p.1183-1191, 1992.
- PIEKIELEK, W.P.; FOX, R.H.; TOTH, J.D.; MACNEAL, K.E. Use of a chlorophyll meter at the early dent stage of corn to evaluate nitrogen sufficiency. **Agronomy Journal**, Madison, v.87, p.403-408, 1995.
- PIEKIELEK, W.P.; FOX, R.H. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress N requirements for maize. **Agronomy Journal**, Madison, v.84, p.59-65, 1992.
- PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.975, p.384-394, 1989.
- SCHEPERS, J.S.; FRANCIS, D.D.; VIGEL, M.; BELOW, F.E. Comparison of corn leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Monticello, v.23, p.2.173-2.187, 1992.
- TELES, F.F.F.; BARBOSA, F.F.; PINHEIRO, P.A.P. A simple technique for industrial analysis of total chlorophyll. **Revista Ceres**, Viçosa, v.24, p.338-340, 1977.

12. REAÇÃO DE HILL EM CLOROPLASTOS ISOLADOS

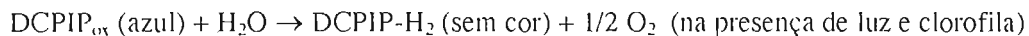
CUIDADOS

- Em todo o processo, procure manter os cloroplastos sob temperatura próxima a 0°C para que eles retenham sua atividade. Portanto, todos os recipientes, instrumentos e soluções devem estar gelados no momento de uso.

12.1. Introdução

Em 1937, Hill verificou que cloroplastos isolados em suspensão, quando expostos à luz na presença de receptores de elétrons, simultaneamente produzem O₂ e reduzem os receptores de elétrons adicionados. Esse processo ficou conhecido como *Reação de Hill*. Acredita-se que esta reação se deva ao *fotossistema II* (PS II), um dos sistemas fotoquímicos primários da FS. Cada um dos dois fotossistemas possui um sistema definido para captação da luz (arranjo de moléculas de pigmentos) e partículas com atividade para o *fotossistema I* (PS I) podem ser separadas daquelas com atividade para o PS II, por meio de centrifugação de cloroplastos fragmentados. A análise dos dois tipos de partículas assim separadas produz diferentes valores para a razão clorofila a/clorofila b (Boardman & Anderson, 1964). A atividade do PS II pode variar entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie, quando submetidos a diferentes intensidades luminosas (Bjorkman, 1968).

Atualmente, acredita-se que receptores de elétrons têm de ser adicionados, para que ocorra a reação de Hill, porque os receptores naturais são perdidos no processo de isolamento de cloroplastos. Hill (1937) utilizou oxalato férrico e outros compostos contendo Fe⁺³ como receptores de elétrons e mediu a taxa da reação por meio da produção de O₂. Nesta abordagem, outro receptor, o DCPIP, será utilizado. A taxa de redução deste composto pode ser medida por fotometria, medindo-se a taxa de desaparecimento da coloração azul da forma oxidada do DCPIP, conforme o esquema:



O método descrito para a obtenção de cloroplastos é rápido e simples. Outros métodos, mais sofisticados, estão disponíveis na literatura. Caso seja necessário isolar cloroplastos do mesófilo em larga escala, o procedimento de Jenkins & Russ (1984), pelo qual se utiliza gradiente de *Percoll*, será preferível.

12.2. Procedimento

12.2.1. Preparo das Suspensões de Cloroplastos

- A. Remova os pecíolos e nervuras centrais e lave as folhas em água gelada, deixando secar sobre papel absorvente.
- B. Pese 8-10 g MV e corte o material em pequenos fragmentos, com cerca de 1 cm². A seguir, macere o material em gral de porcelana (a 2°C) com 20 mL de solução de sacarose 0,5 M a 2°C, por 4 min. Adicione mais 20 mL de sacarose 0,5 M e macere por 30 segundos.

- C. Filtre o homogeneizado em quatro camadas de gaze. Pressione os resíduos contra a gaze, para aumentar o rendimento da filtração. Divida o filtrado em duas partes iguais e centrifugue-os (0°C) a 200 x g, por 15 min. O sedimento resultante irá conter células intactas e resíduos de parede celular, ficando os cloroplastos no sobrenadante.
- D. Transfira os sobrenadantes para dois tubos gelados, tomando cuidado para não ressuspender os sedimentos, que não são firmes. Centrifugue os dois tubos (0°C) a 1.000 x g, por 7 min. O sedimento resultante irá conter os cloroplastos.
- E. Descarte os sobrenadantes e ressuspenda cada sedimento, por agitação suave com bastão de vidro, em 12 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. Combine então as duas porções de suspensão de cloroplastos.

12.2.2. Diluição das Suspensões de Cloroplastos

- Para se assegurar que a reação de Hill irá se processar em uma taxa mensurável, a quantidade de clorofila na mistura para a reação tem de ser ajustada a um valor conhecido. Isso também permite que a taxa de redução do DCPIP possa ser expressa por unidade de clorofila.
- A. Misture 1,0 mL da suspensão-estoque de cloroplastos com 20 mL de acetona 80% (v/v) e meça a absorbância a 652 nm (usando branco de acetona 80%). Multiplique a absorbância por 0,58 para obter a concentração de clorofila da suspensão-estoque, em mg.mL⁻¹.
 - B. Dilua 10 mL da suspensão-estoque de cloroplastos em tampão fosfato 0,1 M para obter uma concentração final de clorofila de 0,05 ou 0,2 mg.mL⁻¹ (respectivamente, para amostras iniciais de 8 ou 10 g; item 12.2.1, passo B.).

12.2.3. Preparo das Misturas para a Reação

- Prepare oito misturas, conforme indicado abaixo, mas **não adicione os cloroplastos ainda**. Use pequenos tubos de ensaio que possam ser encaixados no espectrofotômetro. Caso contrário, faça adequação do volume da amostra para a cubeta do espectrofotômetro.

Tubo N°	Tampão fosfato 0,1 M	Água	DCPIP 0,2 M	Suspensão de cloroplastos
1 a 7	1,0 mL	2,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
8	2,0 mL	2,0 mL	1,0 mL	0

12.2.4. Medição da Atividade da Reação de Hill

- A. Apague as luzes do recinto e marque com fita adesiva as áreas no piso, em frente à fonte de luz, que estejam recebendo 40, 80, 120, 200, 400 e 800 ft-c de iluminação. Em cada um destas áreas coloque um béquer contendo água gelada. *A luz incidente sobre um béquer não pode ser obstruída por outro béquer.*
- B. Desligue a fonte de luz, adicione a suspensão de cloroplastos a cada tubo (exceto o n° 8), vede o tubo com *Parafilm* e misture, por inversão, diversas vezes. Leia a absorbância a 600 nm (use água como branco).
- C. Coloque os tubos de 1 a 6 nos béqueres, de maneira que o tubo 1 receba 40 ft-c, o 2 receba 80 ft-c, e assim por diante. Envolve o tubo 7 com lâmina de alumínio e coloque os tubos 7 e 8 na área do piso recebendo 800 ft-c.
- D. Ligue a fonte de luz por 5 min e, a seguir, a desligue. Leia os tubos de 1 a 6 (600 nm) e retorne-os aos béqueres. Leia os tubos de 1 a 6 a intervalos de 5 min (contando somente o tempo sob iluminação) por 30 min. Leia os tubos 7 e 8 quando o experimento tiver terminado.

- E. Faça um gráfico da absorbância (a 600 nm) x tempo (ou seja, somente o tempo em que a iluminação esteve ligada). Para os tubos de 1 a 7, calcule a mudança em absorbância durante os 10 primeiros minutos de exposição à luz. Esses dados devem ser convertidos em unidades de $\mu\text{moles DCPIP reduzidos. mg}^{-1} \text{clorofila.h}^{-1}$.
- F. Calcule a quantidade de DCPIP reduzida em cada tubo nos primeiros 10 min de iluminação pela mudança na absorbância, assumindo que toda a absorbância do tubo 8 é devida à oxidação do DCPIP e que o DCPIP oxidado segue a lei de Beer. Por exemplo, se o tubo 8 tem uma absorbância de 0,7 e o tubo 6 de 0,35, após 10 min, a quantidade de DCPIP oxidado no tubo 8 e, antes da reação, no tubo 6, é dada por:

$$\begin{aligned} & (0,2 \text{ mM}) \cdot (1 \text{ mL}) \\ & = (200 \text{ M}) \cdot (0,001 \text{ L}) \\ & = 0,2 \mu\text{mole} \end{aligned}$$

- G. Calcule a quantidade de DCPIP reduzido (μmoles). De acordo com a lei de Beer, sabe-se que a concentração é proporcional à absorbância (aqui, o volume é constante e pode ser ignorado), portanto:

$$\mu\text{moles DCPIP reduzido} = 0,2 \mu\text{moles} \cdot \frac{0,35}{0,70} = 0,1 \mu\text{moles}$$

- H. Faça gráficos da redução de DCPIP ($\mu\text{moles DCPIP.mg}^{-1} \text{clorofila.h}^{-1}$) x intensidade luminosa.

12.3. Referências Bibliográficas

- BJORKMAN, O. Further studies on differentiation of photosynthetic properties in sun and shade ecotypes of *Solidago virgaurea*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.21, p.84-99, 1968.
- BOARDMAN, N.K.; ANDERSON, J.M. Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll a and b and their possible role in the light reactions of photosynthesis. **Nature**, London, v.203, p.166-167, 1964.
- HILL, R. Oxygen evolved by isolated chloroplasts. **Nature**, London, v.139, p.881-882, 1937.
- JENKINS, C.L.D.; RUSS, V.J. Large scale, rapid preparation of functional mesophyll chloroplasts from *Zea mays* and other C_4 species. **Plant Science Letters**, Limerick, v.35, p.19-24, 1984.

13. ÁCIDOS NUCLÉICOS - EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO

CUIDADOS

- Mantenha todos os materiais gelados, para evitar hidrólise dos ácidos nucleicos pelo calor.
- A amostra pode ser tratada com etanol fervente, antes da extração.
- Procure obter, durante a extração, um homogeneizado de consistência cremosa, para que o sedimento centrifugado seja firme.

13.1. Introdução

Desde a década de 40 sabe-se que o DNA constitui o material genético de todos os organismos. A determinação do nível de DNA proporciona uma boa estimativa do número de células vivas em um tecido e pode ser usada na comparação de processos de desenvolvimento, porque ele ocorre quase sempre em níveis constantes nas células somáticas.

O DNA é a fonte primária de codificação das proteínas a serem produzidas durante o crescimento. Todavia, esse processo depende de vários tipos de RNA. Quando a taxa de crescimento é intensa, o teor de RNA do tecido é elevado. Portanto, o nível de RNA é um indicador do potencial ou da ocorrência de expansão celular.

A determinação dos teores de DNA e RNA em tecidos é complicada por vários fatores interferentes. Por isso, grande parte dos métodos disponíveis é lenta e tediosa e nem sempre propicia extração total dos ácidos nucleicos presentes nas amostras. As derivações da técnica de Schmidt & Thannhauser (1945), com a qual o RNA é degradado por tratamento alcalino e o DNA permanece não hidrolisado, continuam sendo uma escolha atraente, dada sua precisão e relativa simplicidade. A técnica apresentada neste capítulo é uma adaptação do método preconizado por Smillie & Kortkov (1960), pela qual os ácidos nucleicos extraídos poderão, subseqüentemente, ser submetidos a testes adicionais. Um método de caracterização muito utilizado é a determinação das razões entre bases, por meio de cromatografia de camada fina, em placa de celulose ou em tira de papel (Starr & Ramberg, 1966).

13.2. Fundamento

Sob a ação de bases diluídas (0,1-1,0 N) e baixas temperaturas, o RNA é completamente hidrolisado, resultando em uma mistura de monofosfatos de nucleosídeos 2' e 3'. A ação inicial das bases sobre o RNA é a conversão de ligações de diéster fosfatos em um intermediário cíclico, o qual é então hidrolisado na mistura de monoésteres 2' e 3'. Visto que o RNA possui um terminal 3'-OH, os álcalis removerão a ligação 5'-fosfato, liberando um nucleosídeo. Na outra extremidade da molécula de RNA (5'-fosfato), a ação de álcalis resultará na formação de 2'(3'), 5'-nucleosídeo difosfato. Embora cada nucleotídeo liberado (ácidos adenílico, citidílico, guanílico e uridílico) apresente seu próprio comprimento de onda para absorção máxima, a combinação dos componentes exibe uma média de entre 258 a 260 nm.

Apesar de se dissolver na solução alcalina, o DNA é resistente à hidrólise de bases, devido à ausência da 2'-hidroxila na desoxirribose. Essa diferença é utilizada no método de determinação, pelo qual o RNA é quebrado, permanecendo em solução, enquanto o DNA dissolvido é subseqüentemente precipitado, pela adição de ácidos fortes (ex. ácido perclórico).

13.3. Extração da Amostra

- A. Triture 2 g de tecido foliar recém-coletado em gral de porcelana a 4°C, contendo 20 mL de solução de ácido fórmico 50 mM em metanol absoluto e 0,5 g de areia quartzosa. Conduza as demais operações a 4°C, a não ser que outras especificações sejam apresentadas.
- B. Transfira o homogeneizado, quantitativamente, para tubos de centrifugação de 50 mL, usando 5 mL adicionais da solução de ácido fórmico para lavar o homogeneizado no tubo.
- C. Centrifugue o homogeneizado a 5.000 x g, por 15 min. Descarte o sobrenadante.
- D. Extraia o sedimento no mesmo tubo de centrifugação, com 10 mL de ácido perclórico 2 N. Esse passo dissolve os nucleotídeos livres, para que não interfiram nas análises.
- E. Centrifugue o extrato (5.000 x g, por 15 min), colete o sedimento e descarte o sobrenadante.
- F. Use alíquotas de 20 mL dos seguintes solventes, em seqüência, para extração adicional:
 - a) etanol 95% (v/v) a 4°C; e
 - b) clorofórmio-metanol (2:1), temperatura ambiente.
- G. Centrifugue a amostra (3.000 x g, por 10 min), após cada extração, coletando o sedimento e descartando o sobrenadante. O etanol remove o ácido perclórico. A mistura clorofórmio-metanol remove os lipídios.
- H. Seque o último sedimento obtido em banho-maria momo. O pó resultante contém ácidos nucléicos, proteínas, amido e celulose.

13.4. Extração do RNA

- A. Submeta o pó à hidrólise em 10 mL de KOH 0,3 N a 37°C, por 12-16 h, ou de um dia para o outro. Diminua o tempo aumentando a temperatura e diminuindo a concentração de KOH. Tampe os tubos, sem vedar. Centrifugue o material a 5.000 x g, por 15 min.
- B. Conserve o sobrenadante (o qual contém nucleotídeos de RNA, DNA e proteínas).
- C. Lave o sedimento com 2-3 mL de KOH 0,1 N e conserve o sobrenadante obtido. Esse passo remove os nucleotídeos e proteínas remanescentes nos resíduos.
- D. Combine os sobrenadantes dos passos C. e D. e esfrie em gelo.
- E. Faça, a seguir, as seguintes manipulações:
 - a) adicione 800 µL de MgCl₂.
 - b) ajuste o pH para cerca de 2,0 (retire alíquota com bastão de vidro e verifique em papel indicador) com ácido perclórico 2 N (CUIDADO!).
 - c) adicione 20 mL de etanol 95% (v/v).
- F. Deixe a mistura repousar sobre gelo ou no refrigerador (mínimo de 20 min e máximo de 12 h).
- G. Centrifugue o material a 5.000 x g a 4°C, por 15 min. O passo F. produz um precipitado (DNA e KClO₄-proteínas). O sobrenadante contém nucleotídeos de RNA e deve ser conservado.
- H. Lave o sedimento com 1-2 mL de ácido perclórico 0,2 N, centrifugue a mistura (5.000 x g, por 10 min), colete o sobrenadante e combine este volume ao sobrenadante obtido no passo H. **Mantenha o sedimento (contendo DNA) a -4°C.**
- I. Ajuste o pH do sobrenadante (nucleotídeos de RNA) para 7,2 com KOH 1 N. Esfrie a amostra em gelo e centrifugue-a a 3.000 x g, por 5 min. Descarte o sedimento (perclorato de potássio).
- J. Passe o sobrenadante em uma coluna 0,5 x 8 cm com resina de 200 mesh, forma clorídrica (disponível comercialmente), para remover impurezas do RNA. Os nucleotídeos se aderem à resina e as impurezas são eluídas. Lave a coluna com 10 mL de água destilada.
- K. Faça a eluição do RNA com 20 mL de solução HCl-NaCl (20 mL de HCl 10 N e 5,6 g de NaCl em 240 mL de água). Colete os primeiros 20 mL do material eluído. Conserve essa solução para as análises quantitativas de RNA. Anote o volume final de cada uma das duas amostras.

13.5. Extração do DNA

- A. Faça a hidrólise do DNA no sedimento obtido no item 13.4., passo J., com 5 mL de ácido perclórico 1 N a 70°C, por 15 min.
- B. Centrifugue o hidrolisado (5.000 x g a 15°C, por 15 min) e lave o sedimento com ácido perclórico 0,5 N aquecido.
- C. Combine os volumes resultantes da centrifugação e lavagem, anotando o volume.
- D. Determine o teor de DNA pelo método do reagente de difenilamina ou pela absorção de UV.

13.6. Determinação do Teor de Ácidos Nucléicos

13.6.1. Método da Absorção Ultravioleta (Cherry, 1962)

- O DNA e o RNA possuem padrões característicos de absorção na região ultravioleta do espectro, com absorção máxima a 260 nm, mínima a 230-235 nm e razão de absorção 260/280 e 260/230 em torno de 2,0. Portanto, verificações na amplitude 230-235 nm podem indicar o grau de pureza do preparado e a quantidade de ácidos nucleicos presentes.
- Os nucleotídeos são estimados pela diferença na absorbância entre 260 e 290 nm, obtida com o sobrenadante hialino. A diferença entre a absorbância máxima e a mínima é multiplicada por 57, para se obter a quantidade de ácidos nucleicos totais, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

13.6.2. Determinação de DNA pelo Reagente de Difenilamina (Giles & Myers, 1965)

13.6.2.1. Procedimento

- A. Misture 1 mL da amostra (DNA ou DNA-RNA) com 2 mL do reagente de difenilamina. Prepare o branco usando o mesmo solvente da amostra. Opcionalmente, aqueça a amostra a 100°C, por 10 min, e faça a leitura a 600 nm (a sensibilidade diminui!).
- B. Use períodos de aquecimento mais prolongados, temperaturas menores e adição de acetil aldeídos (faça testes preliminares, para determinar os níveis ideais), para melhorar a sensibilidade. Faça a incubação por 15-17 h, a 25-30°C e leia a D.O. a 600 nm.
- C. Aqueça a amostra a 35°C por 5 h e leia a 600 nm, se houver limitação de tempo para conduzir a análise. O desenvolvimento da cor atingirá cerca de 80% do máximo possível.
- D. Use a d-2-desoxirribose (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir de solução-estoque de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) como padrão. Para as determinações de RNA, use a AMP como padrão (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir de solução-estoque de 500 $\mu\text{g AMP.mL}^{-1}$). Faça a curva padrão ou equação de regressão.

13.6.2.2. Reagentes

A. Aldeído Acético	Transfira 1 mL de aldeído acético a 4°C (hialino, não polimerizado) para 50 mL de água. A solução é estável por vários meses (frasco bem fechado, a 4°C).
B. Reagente de Difenilamina	a) Dissolva 1,5 mg de difenilamina em 100 mL de ácido acético glacial contendo 1,5 mL de H ₂ SO ₄ concentrado. b) Adicione, imediatamente antes de usar, 0,1 mL de solução aquosa de aldeído acético 1,6% (v/v), para cada 20 mL do reagente.

OBSERVAÇÃO

- Alguns cientistas não utilizam o ácido sulfúrico no preparo do reagente de difenilamina, adicionando aldeído acético à amostra, para diminuir a leitura do branco. **Procedimento:** adicione 2 mL de difenilamina 4% (p/v) (dissolvida em ácido acético glacial) a 2 mL da solução de DNA em ácido perclórico 10% (p/v) (ou 1 N), faça incubação até o dia seguinte, a 30°C, adicionando então 0,1 mL de aldeído acético (1,6 mg.mL⁻¹ de água). Leia a diferença em D.O. a 595-700 nm contra o branco, lido a 595-700 nm.
- Se não houver disponibilidade de aldeído acético, dissolva 1 g de difenilamina purificada em 100 mL de ácido acético glacial com 2,75 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução será válida por alguns dias, desde que mantida a 4°C.

13.6.3. Determinação de RNA pelo Reagente de Orcinol (Smillie & Krotkov, 1960)

- A. Dissolva, **imediatamente antes do uso**, 1g de orcinol em 100 mL de HCl concentrado, com 0,5 mL de solução de FeCl₃ 10% (p/v). Este reagente é usado tanto para DNA quanto para RNA.
- B. Aqueça 1 mL do hidrolisado de RNA (obtido no item 13.4.) com 2 mL do reagente de orcinol em tubo de ensaio fechado, durante 20 min, em água fervente.
- C. Faça a leitura a 660 nm (para a intensidade da cor verde obtida).
- D. Prepare a curva padrão, tendo a absorvância como função de microgramas de ácido adenílico, a partir de solução-estoque 0,5 mg.mL⁻¹. O RNA de levedura pode também ser usado como padrão.

13.7. Referências Bibliográficas

- CHERRY, J.H. Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.37, p.670-678, 1962.
- GILES, K.W.; MYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, London: v.206, p.93, 1965.
- SMILLIE, R.M.; KROTKOV, G. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.38, p.31-49, 1960.
- SCHMIDT, G.; THANNHAUSER, S. A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phospho-proteins in animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.161, p.83-89, 1945.
- STARR, J.L.; RAMBERG, B. Two-dimensional thin-layer chromatography of the major mononucleotides of ribonucleic acid. **Nature**, London, v.211, p.414-415, 1966.

14. RNA - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

CUIDADOS

- Use luvas e óculos ao manipular o fenol - além de tóxico, ele causa queimaduras graves.
- Redestile o fenol somente na capela para exaustão de gases.
- Lembre-se de usar pontas de pipeta longas para aplicar as amostras nos géis de PAGE.

14.1. Introdução

Algumas vezes, além do teor de RNA, há interesse em conhecer sua composição. Para esses casos, procedimentos específicos devem ser utilizados, como o fracionamento de RNA em géis diluídos de poliacrilamida (Loening & Ingle, 1967). As moléculas de RNA e DNA migram no gel em relação inversa ao logaritmo do PM. Géis de poliacrilamida compostos permitem separar as duas subunidades de maior PM dos ribossomos citoplasmáticos (25S, de $PM=1,3 \times 10^6$, e 18S, de $PM=0,7 \times 10^6$) entre si e também com relação às duas subunidades de maior PM dos ribossomos dos cloroplastos (23S, de $PM=1,1 \times 10^6$, e 16S, de $PM=0,56 \times 10^6$).

Em outras situações, há necessidade de purificação do mRNA, para uso na tradução *in vitro*. Nesse caso, o perfil eletroforético de RNA é útil para se associar determinada(s) proteína(s) a um dado caráter (ex. Kazuoka & Oeda, 1992). As abordagens descritas visam atender a essas situações.

14.2. Extração de RNA

14.2.1. Método de Bourque (1973)

- Prepare o seguinte tampão de extração: SDS 1% (p/v), KCl 25 mM, Tris-HCl 25mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 25 mM; pH 7,8.
- Congele 5 mg de tecido vegetal recém-coletado em N_2 líquido. Em seguida, triture o tecido em gral de porcelana a 4°C, com o auxílio de uma pequena quantidade de N_2 líquido. Mantenha o pó obtido a -80°C, até ser processado. Use alíquotas de 5 g.
- Misture a alíquota com 50 mL de tampão de extração e 50 mL de fenol 90% (v/v) redestilado, com o auxílio de bastão de vidro. Certifique-se de que o tecido está imerso no fluido.
- Transfira o homogeneizado para um tubo de centrifugação de plástico e tampe-o firmemente. Agite-o vigorosamente, a intervalos, durante 30 min (temperatura ambiente).
- Centrifugue a amostra (6.000 x g a 4°C, por 5 min).
- Remova o fenol (camada inferior), deixando o material vegetal e a camada aquosa superior.
- Faça nova extração da camada aquosa e material vegetal, com metade do volume de fenol, durante 15 min. Em seguida, centrifugue a amostra (500 x g a 4°C, por 10 min).
- Colete a camada aquosa superior e adicione NaCl, até obter a concentração de 2 M.
- Adicione dois volumes de etanol 95% (v/v) a 4°C e deixe os ácidos nucleicos se precipitarem até o dia seguinte, a -20°C (alguns utilizam apenas 2-3 h).
- Colete o precipitado (RNA) por centrifugação (500 x g a 4°C, por 10 min) e lave-o, sucessivamente, com etanol 95% (v/v) e duas mudanças de etanol 100% (v/v), para eliminar o

fenol e o SDS. Após cada lavagem, centrifugue o RNA (500 x g a 4°C, por 10 min) e colete o sedimento. Mantenha os tubos de centrifugação a 4°C.

- K. Ressuspenda o sedimento em um volume mínimo de tampão apropriado (geralmente, 0,5 mL de tampão fosfato 70 mM pH 7,0.g⁻¹ MV) e determine a concentração de RNA. Após estimativa da concentração, o RNA poderá ser usado em fracionamentos em gel de poliacrilamida.

14.2.2. Método do Tiocianato de Guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987)

- A. Prepare a solução desnaturante, com a seguinte composição: tiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 2,5 mM pH 7,0, sarcosil 0,5% (p/v) e BME 0,1 M.
- B. Homogeneize 1 g MV em 10 mL da solução desnaturante (tubo de centrifugação de 50 mL).
- C. Adicione 1,5 mL de NaOAc 2 M pH 4,0, 1,5 mL de fenol e 3,0 mL de clorofórmio-álcool isoamil 49:1. Agite vigorosamente por 30 segundos e deixe esfriar em gelo, por 15 min.
- D. Centrifugue a 9.000 x g (4°C), por 10 min, para separar a fase aquosa.
- E. Adicione 1 volume de isopropanol à fase aquosa e deixe o RNA se precipitar, a -20°C, por 1 h.
- F. Colete o precipitado por centrifugação (500 x g a 4°C, por 10 min) e o dissolva em 3 mL da solução desnaturante.
- G. Precipite de novo o RNA, pela adição de 3 mL de isopropanol e centrifugue a amostra (500 x g a 4°C, por 10 min).
- H. Seque o sedimento de RNA, sob aplicação de vácuo, e o dissolva em 1 mL de água destilada.
- I. Determine o teor de RNA da amostra. Em seguida, o RNA deverá ser purificado, por cromatografia em coluna (oligo-(dT)-celulose), e poderá ser usado como mRNA na tradução *in vitro* (siga as instruções do fornecedor do extrato para a tradução).

14.3. Determinação da Concentração de RNA

- A. Dilua, como primeira tentativa, uma alíquota da solução de RNA em cerca de 20 X, com tampão fosfato 70 mM pH 7,0. Determine a absorvância a 260 nm e calcule a concentração da amostra, assumindo que 1 mg RNA.mL⁻¹ apresenta D.O. = 25 , a 260 nm, em um feixe de luz de 10 mm. Tente obter amostras com 2 mg RNA.mL⁻¹.
- B. Determine o espectro de absorção das amostras de RNA, na amplitude de 220-320 nm. Uma amostra de RNA adequada apresentará uma razão 260/230 de, aproximadamente, 2,5 e razão 260/280 de, aproximadamente, 2,1.
- C. Compare os teores de RNA nos tecidos estudados, usando os valores de concentração e também os volumes obtidos. Conserve as soluções de RNA a -20°C.

14.4. Fracionamento em PAGE

- A maioria dos fracionamentos de RNA por SDS-PAGE é adaptada do método de Bourque & Naylor (1971). Nesta abordagem, é comum as subunidades dos cloroplastos se degradarem rapidamente, causando a aparição de mais de quatro picos de RNA na região de PM superior. Todavia, quando cuidadosamente executado, o método apresenta as seguintes relações:

% Acrilamida no Gel	Peso Molecular (PM)
3-5	> 100.000
5-12	20.000-150.000
10-15	10.000-80.000
> 15	< 15.000

- O fundamento e as recomendações feitas no capítulo 7 são também aplicáveis à SDS-PAGE de RNA. Contudo, existe uma série de distinções que devem ser observadas, conforme abaixo:
 - O gel de disco é preferível, porque a acrilamida diluída tende a se aderir à placa de vidro. Esse problema não ocorre em tubos tipo *Plexiglas*.
 - Os géis para a eletroforese de RNA apresentam concentração de acrilamida bem inferior (2,4-3,0%, p/v) àquelas utilizadas para proteínas. Esses géis são, portanto, mais fluidos, macios, frágeis e de difícil manuseio. Todavia, a concentração baixa é essencial, porque a subunidade 25S ficará excluída, em concentrações maiores que 3%.
 - A adição de SDS 2% (p/v) ao tampão reduz a ação de nucleases, permitindo a corrida em temperatura ambiente.
 - O azul de tolueno, o azul de metileno e outros corantes básicos, formam complexos fortes com o RNA (carregado negativamente) no gel. **Esses corantes não poderão ser usados, caso o SDS seja adicionado ao tampão, pois não haverá descoloração efetiva do gel.**
 - A relação de bisacrilamida para acrilamida é 1:20, embora outras também sejam usadas.
 - A sacarose torna a densidade da amostra maior que a do tampão, permitindo que o RNA se deposite, facilmente, em camadas na parte superior do gel, sem haver difusão.
 - As amostras de RNA devem ser aplicadas em volume pequeno (no máximo 50 µL), para que as bandas fiquem estreitas e a resolução em nível desejado.
 - O RNA tem de estar livre de proteínas, para não se agregar à superfície do gel.
 - Geralmente, aplica-se 10 V.cm⁻¹ (a 5 mA) por gel. A corrida é feita em corrente constante.
 - Separações são obtidas dentro de 3 h, dependendo do comprimento do gel, resolução desejada e corrente e voltagem usadas.
 - A intensidade de coloração da banda é um indicador do teor de RNA, mas não é uma medida precisa.

14.4.1. Eletroforese em Gel de Disco

14.4.1.1. Procedimento

- A. Prepare os tubos de suporte da seguinte maneira:
 - a) Encaixe os pinos de borracha para vedação sobre a respectiva placa de suporte.
 - b) Encaixe as bases dos tubos tipo *Plexiglas* sobre os pinos de borracha.
- B. Adicione 6,25 mL de tampão de corrida e 19,75 mL de água destilada a 5 mL de solução de poliacrilamida 15% (p/v), em um frasco *kitazato*. Agite, com desaeeração, por 30 segundos. A concentração de poliacrilamida do gel será de 2,4% (p/v).
- C. Adicione, em seqüência, 100 µL de TEMED e 0,25 mL de PSA 10% (p/v), com agitação.
- D. Transfira volumes idênticos da solução para os tubos tipo *Plexiglas* (até 1 cm abaixo do topo).
- E. Coloque 100 µL de n-butanol (ou água destilada) no topo cada tubo.
- F. Espere a poliacrilamida polimerizar, em temperatura ambiente (aproximadamente, 40 min).
- G. Remova o n-butanol (ou água destilada) e os pinos de borracha. **Cuidado para não succionar o gel para fora do tubo, ao remover o pino de borracha.** Coloque uma tela de náilon, presa por tira de borracha, na base de cada tubo.
- H. Coloque os tubos nos receptáculos de borracha localizados no reservatório superior do suporte.
- I. Coloque o tampão de corrida no reservatório inferior, certifique-se de que o anodo está conectado e insira as bases dos tubos contendo os géis no tampão, posicionando o reservatório superior sobre o inferior. Remova eventuais bolhas de ar.

- J. Coloque o tampão de corrida no reservatório superior, certificando-se de que o catodo está conectado. Remova eventuais bolhas de ar.
- K. Conecte os eletrodos e aplique 5 mA por gel, durante uma pré-corrida de 1 h, a 4°C.
- L. Dissolva sacarose nas amostras (durante a pré-corrida), até obter a concentração de 10% (p/v). Tente obter amostras com 100-150 µg RNA para 50 µL de volume.
- M. Desligue a fonte de energia e aplique as amostras no topo de cada gel. Atue com rapidez, para prevenir a difusão das bandas.
- N. Coloque 10µL de solução sacarose-azul de bromofenol no topo de um gel sem amostra, para atuar como indicador da corrida.
- O. Coloque uma solução contendo um padrão de RNA (100 µg.mL⁻¹) em um dos tubos.
- P. Ligue a fonte de energia e ajuste a corrente para 5 mA.gel⁻¹, a 4°C. Espere até que o indicador da corrida percorra 3/4 do gel (2-3 h), para desligar a fonte de energia.
- Q. Descarte o tampão dos dois reservatórios, remova os tubos do suporte e retire os géis dos tubos.
- R. Transfira os géis para béqueres com solução de azul de metileno 0,02% (p/v) ou azul de toluidina 0,02% (p/v) em tampão acetato, até que as bandas de RNA se revelem.
- S. Faça a descoloração descartando a solução corante e adicionando água ao béquer. Faça várias trocas da água, ao longo de várias horas.

14.4.1.2. Reagentes

A. Tampão de Corrida	a) Solução-Estoque (5 X): NaH ₂ PO ₄ 0,15 M, Na ₂ EDTA 0,005 M, Tris-HCl 0,18 M; pH 7,8. b) Solução de Trabalho : Uma parte do estoque para quatro partes de água destilada. Adicione SDS até a conc. de 0,2% (p/v), a não ser que os géis venham a ser corados com azul de toluidina.
B. Solução-Estoque de Poliacrilamida	Acrilamida 15% (p/v), bisacrilamida 0,75% (p/v), em água.
C. TEMED	
D. PSA 10% (p/v)	Preparado imediatamente antes do uso.
E Sacarose 10% (p/v)	Na solução contendo a amostra.
F. Azul de metileno 0,02% (p/v)	Em tampão acetato 0,2 N pH 4,7.
G. Azul de toluidina 0,02% (p/v)	Em água

14.4.2. Eletroforese em Placa de Gel de Poliacrilamida Composto

14.4.2.1. Procedimento

- A. Aplique a solução do gel composto poliacrilamida-agarose no sistema de montagem, coloque o pente e deixe polimerizar (40 min) em temperatura ambiente. Evite a formação de bolhas.
- B. Posicione o suporte contendo a placa de gel no aparato de eletroforese.
- C. Coloque o tampão, diluído dez vezes, nos reservatórios superior (catodo) e inferior (anodo). Remova o pente.
- D. Faça uma pré-corrida a 200 V, por 45 min, para remover o excesso de PSA.
- E. Misture cada amostra de RNA com sacarose sólida, de maneira a obter uma solução de sacarose 10% (p/v) (mantenha a concentração de RNA abaixo de 200 µg.mL⁻¹).

- F. Aplique 50-100 μL da amostra de RNA a cada poço, agindo rápido. Reserve um poço para aplicar 50 μL de azul de bromofenol em solução de sacarose 10% (p/v), como indicador da corrida.
- G. Conduza a eletroforese a 100 V, por 2 h, a 4°C.
- H. Desligue a fonte de energia, retire o aparato de suporte e transfira o gel para um recipiente com o corante. Remova o corante, após 1 h, conforme o item 14.4.1.1.
- I. Use padrões, caso haja interesse em estimar o PM da amostra de RNA. Utilizando os valores de R_f , calcule o PM a partir da expressão: $\log M = m \cdot R_f$, em que:

$$M = \text{PM}$$

m = ângulo da reta de regressão

R_f = mobilidade relativa ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

14.4.2.2. Reagentes

A. Estoque de Poli(acrilamida) 20% (p/v)	19 g de acrilamida e 1g de bisacrilamida em 80 mL de água
B. PSA 0,8% (p/v)	Preparado imediatamente antes do uso
C. TEMED 3,2% (v/v)	Preparado imediatamente antes do uso
D. Tampão (10 X)	EDTA 0,01 M, NaH_2PO_4 0,3 M, Tris 0,36 M pH 7,8
B. Gel Composto Poliacrilamida-Agarose	<p>a) Dissolva 0,32 g de agarose em 43,6 mL de água destilada, em forno de microondas, completando o volume para 50 mL, após a dissolução. Opcionalmente, faça refluxo, por 15 min. A solução pode ficar armazenada a 45°C.</p> <p>b) Misture 8 mL de poli(acrilamida) 20% (p/v), 4 mL de TEMED 3,2% (v/v) e 6,14 mL do tampão 10 X e submeta a mistura à incubação a 40°C.</p> <p>c) Esfrie a solução de agarose para 40°C e adicione 2 mL de PSA 0,8% (p/v).</p> <p>d) Misture esta solução com a de poli(acrilamida), obtendo, portanto, um gel composto de poli(acrilamida) 2,5% (p/v) e agarose 0,5% (p/v).</p>

14.5. Referências Bibliográficas

BOURQUE, D.P. A procedure for RNA extraction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.15, p.993-998, 1973.

BOURQUE, D.P.; NAYLOR, A.W. A simple electrophoretic procedure for separation of RNA on mixed agarose-acrylamide gel columns. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.50, p.79-86, 1971.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.162, 156-159, 1987.

KAZUOKA, T.; OEDA, K. Heat-stable COR (cold-regulated) proteins associated with freezing tolerance in spinach. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.33, p.1107-1114, 1992.

LOENING, U.E.; INGLE, J. Diversity of RNA components in green plant tissues. **Nature**, London, v.215, p.79-86, 1967.

15. DNA GENÔMICO - EXTRAÇÃO PELO TAMPÃO CTAB

CUIDADOS

- Limite cada extração a seis tubos, porque o RNA também é precipitado e sua quantidade aumentará, à medida que as amostras ficarem mais tempo esperando processamento.
- Use cronômetro com alarme em todas as operações.
- Faça pelo menos seis ganchos de vidro em ângulo um pouco superior a 90°, colocando pontas de pipetas *Pasteur* em chama de bico de gás. Assim que a ponta da pipeta começar a dobrar, retire-a da chama, para obter o ângulo desejado.
- Nunca submeta o DNA genômico ao agitador *vortex*.
- Descarte os tubos de polipropileno que receberem clorofórmio, pois estarão deformados.
- Os ganchos e tubos de vidro têm de ser descartados, pois estarão contaminados.
- Certifique-se de que o NaCl é **mesmo 5 M**. Concentrações menores causarão precipitação do DNA ainda no passo inicial de extração.

15.1. Introdução

Este método é empregado, com sucesso, na extração de DNA genômico de folhas de milho, mas é aplicável a numerosas espécies cultivadas. Visto que o DNA é extraído intacto, o extrato pode então ser utilizado em análises de restrição. Todavia, alguns cuidados iniciais são importantes. A qualidade do material vegetal e o modo de colheita são cruciais para se obter DNA com integridade para uso. Se o material estiver estressado, o DNA extraído poderá estar degradado. Plantas cultivadas em casa de vegetação são preferíveis àquelas provenientes do campo, por não sofrerem (a não ser em casos raros) interferências de DNA proveniente de contaminações viróticas ou bacterianas.

15.2. Coleta da Amostra

- A. Selecione a parte mais jovem da planta, evitando caules e talos. Não colete tecidos foliares com sintomas de doenças, ataques de pragas ou deficiências nutricionais.
- B. Corte o material com tesoura, limpando as lâminas com toalha de papel entre cortes. Usando luvas, enrole as lâminas foliares (em torno de 30 g) dentro de tubos de centrifugação de polipropileno de 50 mL. Coloque o material no gelo, imediatamente.
- C. Liofilize assim que possível. Lembre-se de fazer alguns furos na tampa de cada tubo, para permitir a saída de água durante a liofilização. Após três dias de liofilização, armazene as amostras a -80°C. Acondicione conjuntos de tubos em sacos plásticos, para evitar a umidade da condensação da água quando o material for manipulado fora do congelador.
- D. Mantenha em cultivo as plantas que serviram de fonte para as amostras, até que a análise de DNA esteja completa. Pode haver necessidade de repetição.

15.3. Moagem

- A. Procure obter um pó da amostra o mais fino possível.

- B. Limpe o moinho entre cada moagem, para reduzir contaminações. Para isso, remova a tampa e passe escova apropriada nos componentes, completando o serviço com ar comprimido. O processo de limpeza é lento e tedioso.
- C. Use, opcionalmente, um minimoedor elétrico de café, agitando o aparelho durante a moagem, para desobstruir as lâminas. Após 10-15 s de moagem, adapte um espaçador na tampa, para reduzir o espaço de movimentação do material. O espaçador pode ser feito com isopor, moldado no formato da tampa e espesso o suficiente para deixar apenas a parte de aço inoxidável da câmara de moagem livre para movimentação. Envolve o isopor com *Parafilm*, para facilitar posterior limpeza. Após colocar o espaçador, moa por mais 30 s.
- D. Triture, opcionalmente, a amostra em gral de porcelana seco a -2°C , para maior controle de contaminação. Use 0,5 g de areia quartzosa e N_2 líquido no procedimento. Procure ganhar tempo, processando quatro amostras de cada vez.
- E. Transfira cada amostra para tubo de centrifugação de polipropileno de 16 mL, feche bem a tampa e armazene a -80°C .

15.4. Procedimento

- Este método é uma adaptação da técnica recomendada por Hoisington et al. (1988).
- A. Coloque 300-500 mg de amostra em tubos de polipropileno graduados de 16 mL.
 - B. Adicione 9 mL do tampão de extração CTAB, misturando o conteúdo por repetidas inversões (um tubo de cada vez). Caso haja formação de grumos, use um bastão de plástico para agilizar o umedecimento do pó. Faça, no máximo, seis tubos de cada vez.
 - C. Coloque, imediatamente, os seis tubos em banho-maria a 60°C , durante 45 min, com inversão ocasional. Deixe repousar, em temperatura ambiente, por 10 min.
 - D. Adicione 4,5 mL de solução clorofórmio-octanol 24:1 a cada tubo, misturando o conteúdo por inversão, durante 5 min.
 - E. Centrifugue os tubos a $900 \times g$ em temperatura ambiente, por 10 min. Certifique-se de que cada tubo exibe a formação de uma *rolha* (ou *plug*) central, formada pelo material vegetal, a qual separa a fração aquosa (situada no topo) e a dos pigmentos (situada no fundo). Poderá haver depósito de areia quartzosa no fundo do tubo.
 - F. Separe, durante a centrifugação, novos tubos de polipropileno graduados de 16 mL e coloque, em cada um deles, 6 mL de isopropanol.
 - G. Transfira, após a centrifugação, a fração aquosa para os tubos com isopropanol. Descarte os tubos centrifugados com os resíduos.
 - H. Misture os conteúdos de cada tubo, fazendo inversão lenta manual de cada um deles, até o DNA se precipitar, na forma de algodão.
 - I. Retire, **IMEDIATAMENTE**, o DNA do tubo, utilizando um gancho de vidro para cada amostra. Transfira o DNA coletado para tubos de vidro descartáveis de 5 mL com solução de NaOAc 0,2 M em etanol 76% (v/v). Deixe repousar por 10-20 min.
 - J. Mergulhe o DNA, durante 5 segundos, em tubo *microfuge* (1,5 mL) com 1 mL de solução de acetato de amônia 10 mM em etanol 76% (v/v). Ao retirar o DNA, pressione-o levemente contra a parede do tubo, usando o gancho de vidro, para retirada do excesso de solução (procure *secar* o DNA o máximo possível). Descarte os tubos de vidro usados no passo I.
 - K. Transfira o DNA para tubo *microfuge* contendo 400 μL de tampão TE.
 - L. Deixe os tubos em agitador lento tipo gangorra, a 4°C , até o dia seguinte, para completar a dissolução do DNA no tampão TE.
 - M. Centrifugue os tubos a 4°C , por 10 min, utilizando a escala máxima da microcentrífuga.

- N. Transfira o sobrenadante para outro tubo *microfuge* e armazene a 4°C, até à determinação.
- O. Determine o teor de DNA em espectrofotômetro e ajuste a concentração de todas as amostras para 2,5 µg.µL⁻¹ (ou para a menor concentração existente no conjunto de amostras).
- P. Armazene as amostras a 4°C. O DNA genômico permanece viável por seis meses.
- Q. Dilua cada amostra (1:100) em tampão TE (ou seja, 10 µL da amostra de DNA + 990 µL TE) e meça a absorbância em espectrofotômetro a 260 nm. Para calcular o teor de DNA da amostra, use a equação:

$$\mu\text{g DNA.mL}^{-1} = \text{D.O.}_{260} \cdot 50 \cdot \frac{\text{fator de diluição}}{5}$$

- R. Use fator de diluição = 100. A divisão por 5 da expressão acima corrige contra a presença de RNA, sendo válida para várias espécies de plantas.

15.5. Reagentes

15.5.1. Tampão de Extração CTAB

Estoque	Volume (mL)					Concentração
	146	219	292	365	730	
H ₂ O	146	219	292	365	730	-
Tris 1 M pH 7,5	20	30	40	50	100	100 mM
NaCl 5 M	28	42	56	70	140	700 mM
EDTA 0,5 M pH 8,0	4	6	8	10	20	10 mM
Total	200	300	400	500	1.000	-
CTAB (g)	2	3	4	5	10	-
BME (g)	2	3	4	5	10	-

- O CTAB e o BME devem ser adicionados somente pouco antes do uso. A solução pronta tem de ser utilizada no mesmo dia.
- A solução-estoque sem CTAB e sem BME pode ser feita em maior escala e armazenada em temperatura ambiente.

15.5.2. Clorofórmio-Octanol 24:1

Estoque	Volume (mL)
Clorofórmio	240
Octanol	10
Total	250

- O clorofórmio é sensível à luz - armazene a solução em vidro âmbar, ou use folha de alumínio.

15.5.3. NaOAc 0,2 M em Etanol 76% (v/v)

Estoque	Volume (mL)	Concentração
Etanol 95% (v/v)	160,00	76% (v/v)
NaOAc 3 M	13,33	0,2 M
H ₂ O	26,67	-
Total	200,00	-

15.5.4. NH₄OAc 10 mM

Estoque	Volume (mL)	Concentração
Etanol 95% (v/v)	80,0	76% (v/v)
NH ₄ OAc 5 M	0,2	0,2 M
H ₂ O	19,8	-
Total	100,0	-

15.5.5. Tampão TE

Estoque	Volume (mL)			Concentração
Tris 1 M pH 8,0	0,5	1,0	5	10 mM
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,1	0,2	1	1 mM
H ₂ O	49,4	98,8	494	-
Total	50	100	500	-

15.6. Referência Bibliográfica

HOISINGTON, D.; GARDINER, J.; GROGAN, R. **RFLP procedures**. Columbia: University of Missouri, 1988. 29p.

16. POLIRRIBOSSOMOS - ANÁLISE QUANTITATIVA

16.1. Introdução

O crescimento requer a síntese de novas proteínas e existe ampla evidência de que esse processo, medido pela agregação de ribossomos em polirribossomos, é rapidamente reduzido em condições de estresse. Da mesma forma, o teor de polirribossomos está diretamente correlacionado à intensidade de crescimento.

As folhas das plantas superiores possuem duas classes de ribossomos, caracterizadas pelos coeficientes de sedimentação de 70S e 80S. Por exemplo, cloroplastos isolados possuem o tipo 70S, os quais se assemelham aos ribossomos de bactérias. Visto que as proteínas para síntese de parede celular e membrana citoplasmática devem ser sintetizadas em polirribossomos ligados ao retículo endoplasmático, ribossomos livres e ribossomos ligados a membranas devem ser separados, para se comparar sua sensibilidade ao estresse. Neste capítulo, descrevemos o método de Larkins & Davies (1975), modificado por Mason & Matsuda (1985), para a avaliação dos efeitos do choque osmótico. Mais recentemente, o método tem sido utilizado também para o estudo do estresse térmico (Perras & Sarhan, 1990).

16.2. Extração

- A. Congele as amostras em N₂ líquido, imediatamente após a coleta.
- B. Triture o material a um pó fino, em gral de porcelana, usando N₂ líquido. Conduza as operações subsequentes a 0-4°C.
- C. Homogeneize o pó obtido (0.2-0,6 g MV) em 10 mL do tampão N^o 1 e filtre-o em duas camadas de gaze.
- D. Centrifugue o filtrado a 1.000 x g, por 5 min, para sedimentar os núcleos e resíduos celulares.
- E. Centrifugue o sobrenadante a 30.000 x g, por 20 min, para separar os ribossomos livres (RL) e aqueles ligados a membranas (RLM).
- F. Colete o sedimento, adicione um volume adequado do tampão N^o1, contendo Triton X-100 1% (v/v) (faça testes preliminares para determinar os níveis ideais) e centrifugue a 30.000 x g, por 20 min.
- G. Adicione Triton X-100 ao sobrenadante do passo E., até obter uma concentração de 1% (v/v) desse detergente, visando isolar os ribossomos totais (RL + RLM). Centrifugue a 30.000 x g, por 20 min.
- H. Fracione o sobrenadante obtido com 3 mL de sacarose 1,5 M com tampão N^o 2 (faça testes preliminares para determinar os níveis ideais), e centrifugue a 200.000 x g, por 4 h.
- I. Ressuspenda o sedimento com ribossomos em tampão N^o 2 e remova substâncias insolúveis por centrifugação a 2.000 x g, por 5 min.
- J. Armazene o material na forma de gotas congeladas em N₂, para fracionamentos posteriores.
- K. Estime o teor de RNA no preparado, submetendo uma alíquota, dissolvida em SDS 0,5% (p/v) aquecido, à absorbância de 260 nm (assume-se que 1 mg.mL⁻¹ de RNA apresenta D.O. de 25).

16.3. Tampões

A. Tampão N ^o 1	Sacarose (livre de RNase) 250 mM, Tris HCl 200 mM pH 8,5, KCl 60 mM, MgCl ₂ 30 mM, DTT 2,5 mM
B. Tampão N ^o 2	Tris HCl 40 mM pH 8,5, KCl 20 mM, MgCl ₂ 10 mM, DTT 2,5 mM

16.4. Fracionamento e Análise de Classes de Tamanhos

- Existem várias abordagens para se conduzir o fracionamento. A seguir, são apresentadas duas alternativas muito utilizadas.

16.4.1. Sedimentação em Gradiente Linear de Sacarose

- A. Coloque 0,5 mL da mistura com ribossomos no topo do gradiente preparado (item 16.7.).
- B. Transfira os tubos para um rotor pré-congelado (-4°C) e faça a centrifugação de sedimentação a $38.000 \times g$, por 2 h. Remova os tubos e faça a montagem para a coleta de gotas.
- C. Lave o fundo do tubo para remoção de graxa (use detergente e etanol) e faça a secagem.
- D. Faça um furo no fundo do tubo com uma agulha fina.
- E. Comece coletando duas ou três frações de gotas. Serão necessários 20-30 tubos numerados.
- F. Adicione 1-3 mL de tampão (volume variável, de acordo com o tamanho da cubeta) de ressuspensão (item 16.7., passo D.) a cada tubo e faça a leitura da D.O. a 260 nm.

16.4.2. Eletroforese em Agarose-Acrilamida

- A. Fracione ribossomos peletizados e ressuspendidos, por meio de eletroforese em gel composto de agarose 0,4% (p/v)-acrilamida 2,0% (p/v), de acordo com Dahlberg et al. (1969), e com razão acrilamida-bisacrilamida de 24:1.
- B. Prepare géis cilíndricos de 0,6 x 6,5 cm e mantenha-os, até o dia seguinte, imersos em tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM, pH = 8,5; KCl 50 mM e MgCl_2 4 mM) a 4°C .
- C. Lave os géis em tampão fresco, coloque-os em tubos e faça uma pré-corrída por 1 h (30 V , 5 mA.gel^{-1}), descartando o tampão.
- D. Esfrie os polissomos em gelo e os misture com tampão de eletroforese, contendo solução de sacarose 5% (p/v)-azul de bromofenol 0,1% (p/v) em quantidade suficiente para proporcionar 20 unidades de D.O. por mL, a 260 nm.
- E. Aplique uma alíquota de 20 μL (0,4 unidades de D.O., a 260 nm) em cada gel.
- F. Corra os géis a 5 mA.gel^{-1} por 4 h a 4°C , substituindo o tampão de corrida a cada hora.
- G. Faça as determinações em espectrofotômetro (varredura de cada gel) a 260 nm.

16.5. Análise dos Perfis

- A. Identifique as frações, obtidas no gradiente de sacarose ou no fracionamento de géis, como M (monorribossomos + subunidades), S (dímeros, trímeros e tetrâmeros) ou LP (pentâmeros e maiores).
- B. Corte cópias dos perfis e as pese para determinar as relações pertinentes.
- C. Calcule a fração de ribossomos em agregados polirribossomais (P/T) como $(\text{SP} + \text{LP})/(\text{M} + \text{SP} + \text{LP})$.
- D. Calcule a fração de polirribossomos presentes na forma de LP (LP/P) como $\text{LP}/(\text{SP} + \text{LP})$.

16.6. Estimativa do Rendimento de Ribossomos

- A. Extraia RL e RLM por centrifugação em sacarose 1,5 M a $200.000 \times g$, por 4 h.
- B. Ressuspenda os sedimentos em KOH 0,3 M e hidrolize a 33°C , por 12 h.
- C. Neutralize os hidrolisados com ácido perclórico, antes de purificar os nucleotídeos por cromatografia de troca iônica.

- D. Determine o nível de ribose no extrato pela reação do orcinol (Smillie & Krotkov, 1960), usando adenosina como padrão.

16.7. Preparo do Gradiente de Sacarose

- A. Selecione, por peso (diferença máxima de 10 mg), tubos de plástico de 5 mL. Escove os tubos, por dentro e por fora, com solução detergente neutra, enxágüe e faça a secagem.
- B. Coloque os tubos nos grampos dos suportes e adicione 0,5 mL de cada camada de sacarose, na seguinte ordem: 25,0; 22,5; 20,0; 17,5; 15,0; 12,5; 10,0; 7,5 e 5,0% (p/v).
- C. Verifique se os pesos dos tubos estão balanceados. Para isso, posicione cada tubo em um béquer pequeno e faça os ajustes com remoção da solução de sacarose 5% (p/v) com pipeta *Pasteur*. Faça com que a diferença em peso seja inferior a 5 mg.
- D. Mantenha os tubos (nos béqueres) em refrigerador, de um dia para o outro, para permitir a difusão das camadas. Lembre-se de que as soluções são compostas por sacarose (5 a 25% p/v) e tampão (5 mM Tris, 7 mM acetato de magnésio e 5 mM BME).

16.8. Referências Bibliográficas

- DAHLBERG, A.E.; DINGMAN, C.W.; PEACOCK, A.C. Electrophoretic characterization of bacterial ribosomes in agarose-acrylamide composite gels. **Journal of Molecular Biology**, London, v.41, p.139-147, 1969.
- LARKINS, B.A.; DAVIES, E. Polyribosomes from peas. V. An attempt to characterize the total, free and membrane-bound polysomal populations. **Plant Physiology**, Rockville, v.55, p.749-756, 1975.
- MASON, H.S.; MATSUDA, K. Polyribosome metabolism, growth and water status in the growing tissues os osmotically stressed plant seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.64, p.95-104, 1985.
- PERRAS, M.; SARHAN, F. Polysome metabolism during cold acclimation in wheat. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.31, p.1083-1089, 1990.
- SMILLIE, R.M.; KROTKOV, G. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.38, p.31-49, 1960.

17. LIPÍDIOS - EXTRAÇÃO E DETECÇÃO

17.1. Introdução

Numerosos estudos têm evidenciado a importância da compartimentalização como mecanismo regulador do metabolismo vegetal. Nas células, essa característica é possível com o controle da permeabilidade das membranas, em que o perfil de lipídios é um dos fatores determinantes.

As membranas vegetais contêm quatro lipídios anfifílicos principais: monogalactosil-diacil-glicerol (MGDG) e digalactosil-diacil-glicerol (DGDG), que são galactolipídios predominantes nas membranas dos cloroplastos; e fosfatidil-colina (PC) e fosfatidil-etanolamina (PE), que são fosfolipídios predominantes na membrana celular. Todas as membranas possuem misturas de lipídios polares, havendo aqueles capazes de espontaneamente se arranjar em camadas duplas (ex. PC e DGDG) e outros, capazes de assumir fase hexagonal (ex. PE e MGDG). Os lipídios possuem PM relativamente elevado e chegam a representar 7% da MS. Portanto, a síntese de lipídios e sua sincronia com o surgimento de mecanismos metabólicos específicos é de interesse considerável.

O objetivo deste capítulo é apresentar algumas técnicas para a extração e purificação de lipídios, com base em diversos relatos (ex. Fishwick & Wright 1967, Rouser et al. 1976, Russel & Harwood 1979 e Nishihara et al. 1980). Adicionalmente, são descritos os métodos para condução de cromatografia de camada fina para a análise quantitativa em tubérculos de batata (essencialmente, o método preconizado por Pelick, 1967) e extração e purificação a partir do isolamento de membranas tilaquóides de espinafre (Sprague & Staehelin, 1983).

17.2. Estudo de Lipídios em Membranas Tilaquóides

17.2.1. Isolamento de Membranas Tilaquóides

- A. Homogeneize pecíolos foliares em liquidificador (copo de 250 mL) com tampão de extração (NaH_2PO_4 0,05M, KCl 0,1M, sacarose 0,3M, pH 7,0) a 4°C. Conduza as operações subsequentes também a 4°C.
- B. Filtre o homogeneizado em gaze e centrifugue-o a 300 x g, por 2 min, para remoção de células intactas e resíduos maiores.
- C. Centrifugue o sobrenadante a 1.000 x g, por 10 min. Conserve o sobrenadante no qual estão as membranas tilaquóides.
- D. Ressuspenda o sedimento, na proporção de 30 mL de tampão para 300 g MV da amostra, para facilitar a extração de lipídios.

17.2.2. Extração de Lipídios

- A. Transfira a suspensão (item 17.2.1., passo D.) para 10 volumes de clorofórmio-metanol (1:2) e filtre a mistura em quatro camadas de gaze.
- B. Lave o resíduo com 3,3 volumes de clorofórmio.
- C. Combine as frações e adicione cinco volumes de água destilada, de maneira a obter uma proporção clorofórmio-metanol-água de 1:1:0,9.
- D. Colete a fração orgânica e lave a fração aquosa duas vezes com um volume de clorofórmio.
- E. Combine as frações orgânicas e concentre a mistura em evaporador giratório.

17.2.3. Purificação e Análise Qualitativa das Classes de Lipídios

- A. Faça a separação do extrato concentrado de membranas tilaquóides ($40-60 \text{ mg.mL}^{-1}$) em coluna cromatográfica de 5,5 cm (d.i.) x 6-8 cm (comp.), com 60-70 g de ácido silícico (Rouser et al., 1976) em solução etérea. A coluna poderá receber 0,8-0,9 g do extrato.
- B. Lave a coluna, após carregamento, com dez volumes de clorofórmio, para remover a maior parte dos pigmentos.
- C. Faça as eluições conforme segue:
 - a) de MGDG: com cinco volumes de clorofórmio-acetona (1:1).
 - b) de DGDG: com 40 volumes de acetona, nas frações iniciais, e
 - c) de fosfolipídios: com dez volumes de metanol.
- D. Conduza a identificação dos lipídios por TLC em sílica gel G, usando clorofórmio-metanol-água (65:25:4) e/ou clorofórmio-metanol-hidróxido de amônio concentrado (65:35:5).
- E. Use vapor de iodo ou borrifação com solução de iodo a 1% (p/v) em metanol para localizar lipídios não associados a pigmentos. Esses lipídios, insaturados, aparecerão como manchas marrons em fundo amarelo.

17.3. Estudo de Lipídios em Extratos Vegetais

17.3.1. Extração Direta

- A. Colete cerca de 1 g de lâmina foliar, esfrie abaixo de 10°C , corte em pedaços e homogeneize em gral de porcelana contendo 10-15 mL de isopropanol (para desativar enzimas hidrolíticas).
- B. Adicione um volume de clorofórmio-metanol (1:2).
- C. Centrifugue ($1.000 \times g$, por 10 min) ou filtre (gaze) o homogeneizado. Conserve o sobrenadante (ou filtrado) e faça nova extração no resíduo mais três vezes, sempre conservando o sobrenadante.
- D. Combine os extratos e transfira a mistura para um funil de separação. Lave a mistura com 1,5 volume de NaCl 0,9% (p/v) (obtendo uma proporção NaCl-solução de lipídios 1:5).
- E. Agite levemente a mistura e deixe-a em repouso até que as camadas se formem.
- F. Centrifugue a mistura a $1.500 \times g$, por 10 min, se não houver formação de camadas.
- G. Colete a camada inferior (clorofórmio) e repita o passo D.
- H. Reduza o volume da camada de lipídios com N_2 ou vácuo, até a obtenção de consistência oleosa, e examine uma alíquota da amostra obtida, em placa de TLC.

17.3.2. Separação de Ácidos Graxos e Lipídios Não Saponificados

- A. Extraia uma alíquota de 1 g com 25-50 mL de solução de KOH 10% (p/v) em etanol 90% (v/v), em banho de vapor (refluxo), por 60 min. Parte dos lipídios será saponificada.
- B. Remova o resíduo por centrifugação a $1.500 \times g$, por 15 min.
- C. Adicione dois volumes de água destilada ao preparado saponificado.
- D. Extraia a fração de esteróis não-saponificáveis com éter de petróleo, em funil de separação (faça testes preliminares para determinar os níveis ideais).
- E. Acidifique a solução (que está alcalina) com H_2SO_4 0,5 N, até atingir um pH em torno de 5.
- F. Extraia os ácidos graxos com éter ou clorofórmio (faça testes preliminares para determinar os níveis ideais). Seque o extrato com Na_2SO_4 anidro.
- G. Reduza o volume da solução com N_2 ou vácuo. Examine uma alíquota em placa de TLC.

17.4. TLC

17.4.1. Preparo das Placas

- Caso não haja placas prontas, estas poderão ser preparadas, de acordo com a seguinte técnica:
 - A. Misture 5 g de sílica gel G, 5 mL de água destilada e 5 mL de etanol, com agitação manual vigorosa. Sem perdas, a mistura é suficiente para quatro placas de 10 x 15 cm².
 - B. Cubra quatro placas de vidro, com a solução, usando um espalhador adequado para distribuir a sílica, em sentido perpendicular à maior dimensão da placa.
 - C. Deixe as placas secarem em temperatura ambiente. Seque as placas em estufa a 100°C, por 10 min. Mantenha as placas em dessecador até o uso.
 - D. Submeta, imediatamente antes do uso, as placas a 100°C, por 10 min, para ativação.
 - E. Evite curvaturas na frente de corrida, fazendo linhas verticais (com uma espátula), antes de revelar a placa.

17.4.2. Fracionamento em Placa Cromatográfica

- A. Aplique amostra de lipídios 2-3 cm acima da base da placa.
- B. Aplique, para separação unidirecional de lipídios neutros, os seguintes solventes, em seqüência: éter isopropílico-ácido acético (24:1) e petróleo-éter sulfúrico-ácido acético (90:10:1). A seguinte separação deverá ser obtida:
 - a) Fosfolipídios permanecendo na origem,
 - b) Monoglicerídios em R_f próximo a 15,
 - c) Diglicerídios em R_f próximo a 50,
 - d) Triglicerídios em R_f próximo a 70, e
 - e) Carboidratos acompanhando o indicador da corrida.
- C. Separe os triglicerídios de acordo com seu grau de insaturação. Para isso, faça impregnação da placa com solução de AgNO₃ 5% (p/v) e faça a revelação com isopropanol-clorofórmio (3:197). Nas várias frações obtidas, o aumento do número de ligações duplas (de 1 para 6) acompanhará decréscimos no R_f.
- D. Separe os fosfolipídios utilizando clorofórmio-metanol-ácido acético-água (170:30:20:7) ou acetona-benzeno-água (91:30:8) como solventes.
- E. Use os seguintes solventes para separar a maioria dos lipídios, em cromatografia bidimensional:
 - a) Na primeira direção: clorofórmio-metanol-ácido acético-água (170:25:25:4), e
 - b) clorofórmio-metanol- NH₄OH 7 M (65:30:4).

OBSERVAÇÃO

- Muitos pesquisadores preferem separar as classes de lipídios por meio de cromatografia em coluna (item 17.2.3, passos A., B. e C.) e então analisar cada classe individualmente, em TLC. Os lipídios neutros serão eluídos e os galactolipídios e fosfolipídios absorvidos. Após, faz-se a eluição destes últimos.

17.4.3. Notas sobre a Detecção

- Os lipídios podem ser detectados, pela borrrificação das placas de cromatografia, com as seguintes classes de corantes:
 - Quemiluminescentes, sob irradiação UV: *Rhodamine B* a 0,5% (p/v), produzem manchas amarelas ou verdes em fundo cor-de-rosa; e 2',7'-diclorofluorescina a 0,2% (p/v) em etanol proporciona manchas verdes fluorescentes, em fundo violeta. Os lipídios não sofrem alterações significativas.
 - Ácido Sulfúrico 25% (p/v), seguido de aquecimento a 230°C: esteróis são revelados em púrpura-vermelho, glicolipídios em marrom-vermelho, sulfolipídios em vermelho e lipídios restantes em pardo. O método não possui especificidade e destrói as amostras.
 - Ninidrina: detecta fosfolipídios que contenham etanolamina e serina.
 - Antrona 0,2% (p/v) em H₂SO₄ concentrado, com aquecimento a 70°C, por 20 min: detecta sulfolipídios, em coloração violeta, e galactolipídios, em coloração verde.
 - Azul de Bromotimol: os lipídios são revelados em manchas ocre, em fundo azul, o qual muda rapidamente para o amarelo. As manchas continuam visíveis e sua cor pode ser intensificada, em tom azul, com aplicação de vapor de amônia. Todavia, a intensidade de coloração das manchas não tem valor quantitativo. Preparo do Azul de Bromotimol: 50 mg de azul de bromotimol, 1,25 g de ácido bórico, 8 mL de NaOH 1 N e 112 mL de H₂O.
- A. Seque as placas e faça borrrificação com solução ácido sulfúrico 50% (v/v) em dicromato de potássio 1% (p/v). Trabalhe na capela para exaustão de gases.
- B. Aqueça as placas em estufa a 100-120°C, por 25-50 min (ou até à visualização das manchas).
- C. Faça borrrificação com vapor de iodo, solução de iodo 1% (p/v) em metanol ou permanganato de potássio 1% (p/v), para separar os lipídios insaturados.
- D. Faça borrrificação com a mistura acetato de chumbo (2%, p/v)-sulfeto de amônio (2%, p/v) 1:1, para separar os ácidos graxos.
- E. Use solução de ninidrina 0,3% (p/v) em acetona, para separar os aminolipídios.

17.5. Referências Bibliográficas

- FISHWICK, M.J.; WRIGHT, A.J. Comparison of methods for extraction of plant lipids. *Phytochemistry*, Elmsford, v.16, p.1507-1512, 1977.
- NISHIHARA, M.; YOKOTA, K.; KITO, M. Lipid molecular species composition of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.617, p.12-19, 1980.
- PELICK, N. Some practical aspects of thin-layer chromatography of lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Champaign, v.42, p.393-398, 1965.
- ROUSER, G.; KRITCHEVSKY, G.; YAMAMOTO, A. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids. In: MARINETTI, G.V. ed. *Lipid chromatographic analysis*. New York: Marcel Dekker, 1976. p.713-725.

- RUSSEL, N.J.; HARWOOD, J.L. Changes in the acyl lipid composition of photosynthetic bacteria grown under photosynthetic and non-photosynthetic conditions. **Biochemical Journal**, Colchester, v.181, p.339-345, 1979.
- SPRAGUE, S.G.; STAEHELIN, A. Bilayer and non-bilayer configurations of mixtures of isolated chloroplast membrane lipids. In: THOMSON, W.W.; MUDD, J.B.; GIBBS, M. eds. **Biosynthesis and function of plant lipids**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1983. p.144-159.

18. SOLUÇÃO NUTRITIVA DE HOAGLAND

CUIDADOS

- As soluções-estoque E, F, G e H somente serão preparadas para estudos de deficiência.
- Ao adicionar cada alíquota de solução-estoque ao volume final, agite com bastão.
- Não pipete diretamente da solução-estoque, para não contaminá-la com íons que possam estar na pipeta. Em vez disso, coloque um pouco da solução-estoque em um pequeno béquer e proceda então com a pipetagem.

18.1. Introdução

O cultivo de plantas superiores em meio líquido tem permitido grandes progressos no conhecimento da nutrição de plantas e, mais recentemente, das reações imediatas ao choque osmótico. Embora meios líquidos de cultivo estejam em uso desde o século XVII, a formulação de Hoagland e colaboradores, baseada nas proporções de nutrientes presentes nos extratos aquosos de solos férteis da Califórnia e modificada para suprir as necessidades do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), tornou-se a de uso mais consagrado. Variações dessa técnica incluem a *hidroponia*, na qual as raízes ficam submersas em solução nutritiva recirculante, e o cultivo em meio sólido agregado (por exemplo, areia, cascalho ou vermiculita), o qual é irrigado com a solução. Neste capítulo são apresentadas técnicas para o preparo da solução nutritiva de Hoagland.

18.2. Preparo das Soluções-Estoque

TABELA 6. Soluções-estoque para preparo da solução nutritiva de Hoagland (adaptado de Hoagland & Arnon, 1938)*.

Solução-estoque	Composto	Concentração	Quantidade (g.L ⁻¹)	Volume necessário para 20 litros (mL)
A	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,0 M	236,1	100
B	KNO ₃	1,0 M	101,1	100
C	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 M	246,4	40
D	KH ₂ PO ₄	1,0 M	136,1	20
E (p/ deficiências)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O	0,01 M	2,52	
F (p/ deficiências)	K ₂ SO ₄	0,5 M	87,2	
G (p/ deficiências)	CaSO ₄ .2H ₂ O	0,01 M	1,72	
H (p/ deficiências)	Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,0 M	256,4	
I	Microelementos			20
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	
		H ₃ BO ₃	2,86	
		H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,09	
		MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	
J	FeEDTA	Vide instruções	abaixo	20

* A recomendação original inclui a adição de tartarato de ferro (0,5%, p/v) a 1 mL.L⁻¹, a cada duas semanas. Todavia, desde a década de 50, o uso de quelatos, como o FeEDTA, tem prevalecido.

18.3. Preparo do Quelato de Ferro

- Os cátions de Fe são relativamente insolúveis em soluções nutritivas, quando fornecidos como sais inorgânicos (especialmente em pH próximo a 5). Eles reagem com a hidroxila e se precipitam em óxidos insolúveis. Por isso, principalmente cereais e gramas não conseguem absorver Fe em quantidade suficiente.
- Uma alternativa é o uso de quelatos. Todavia, formulações como a de Jacobson (1951) (Fe-EDTA) causam queda no pH e nem todo o Fe necessário é quelatinizado (a correção do pH não é rápida o suficiente para prevenir perdas). Além disso, o FeEDTA adiciona S e K, comprometendo estudos de deficiência mineral. Por isso, o método de Steiner & Van Winden (1970) tem se consagrado para o preparo do FeEDTA.

A. Dissolva 26,2 g de EDTA em 500 mL de água a 70°C com:

279,8 mL de KOH 1 N opção 1

283,6 mL de KOH 1 N opção 2

B. Dissolva, em 300 mL de água a 70°C:

24,9 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ opção 1

17,8 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ opção 2

C. Misture A. e B., adicione água até 950 mL (a 50°C) e submeta à aeração vigorosa, por cerca de 12 h. Complete o volume para 1.000 mL, com água. O pH deverá estar em torno de 5,5 e a concentração será de 5.000 mg de $\text{Fe} \cdot \text{L}^{-1}$ (ou 286,6 meq Fe^{+3} , ou 89,5 moles de Fe).

CUIDADOS

- Na prática, uma dificuldade é conseguir que o sulfato ferroso se dissolva, visto que ele produz um precipitado de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Para solucionar o problema, o sulfato ferroso deve ser dissolvido em água com 4 mL de H_2SO_4 1 N, antes de ser adicionado à solução com EDTA e KOH.
- Um bom indicativo de que todo o Fe foi quelatinizado é a coloração da solução, a qual deve ser marrom-amarelada (ou avermelhada) escura.

18.4. Preparo de Na_2FeEDTA

- Alguns pesquisadores preferem o sal dissódico de EDTA. Essa opção somente é válida para estudos em que a ausência de Na^+ não seja necessária.

A. Dissolva 33,3 g de Na_2EDTA em 500 mL de água a 30°C com:

100,4 mL de NaOH 1N opção 1

103,0 mL de NaOH 1N opção 2

B. Adicione água até 950 mL (a 50°C), submetendo-a à aeração vigorosa por cerca de 12 horas. Complete o volume para 1.000 mL, com água. O pH deverá estar em torno de 5,5 e a concentração de Fe similar à do item 18.3.

OBSERVAÇÃO

- O pH dos 20 L da solução deve estar entre 5,0 e 6,0.
- Ajuste o pH, conforme necessário, com HCl 0,1 N ou KOH 0,1 N. Use NaOH 0,1 N para a solução com deficiência de K.
- Alguns autores preparam quelatos de NH_4^+ (vide Steiner & Van Winden, 1970).

18.5. Estudos de Deficiência

- Os volumes de cada solução-estoque a serem adicionados para a condução de estudos de deficiência mineral (Ross, 1974) são apresentados na tabela 7. As deficiências de elementos não-listados podem ser obtidas pela supressão de cada um deles no preparo da solução.

TABELA 7. Volume de cada solução-estoque (mL) a ser usado para o preparo de 4 L de solução nutritiva completa ou com deficiência de elementos*.

Solução	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Completa	20	20	8	4	0	0	0	0	4	4
- K	30	0	8	0	200	0	0	0	4	4
- P	30	0	8	0	0	80	0	0	4	4
- Ca	0	60	8	4	0	0	0	0	4	4
- N	0	0	2	0	200	80	800	0	4	4
- Mg	20	20	0	4	0	40	0	0	4	4
- S	20	20	0	4	0	0	0	2	4	4
- Fe	20	20	8	4	0	0	0	0	4	0

* Para a deficiência de S, a solução-estoque J deve ser preparada pela opção 2 (O2) (item 18.4., passo A.).

18.6. Alterações no pH

- Um problema da solução nutritiva é a tendência de mudança do pH, à medida que as plantas crescem (Fritz, 1983). O pH inicial se alcaliniza, porque as plântulas, em crescimento intenso, absorvem ânions (nitrato, fosfato e sulfato) em intensidade maior do que os cátions (potássio, cálcio e magnésio). Visto que os ânions absorvidos são substituídos por íons hidroxila da planta (ou bicarbonato, produzido pela respiração), o pH sobe. Como o cultivo ótimo para a maioria das espécies ocorre em pH de 5 a 7, este deve ser corrigido. As seguintes estratégias podem ser empregadas:

- A. Adicione ácido ou base forte, conforme necessário.
- B. Substitua a solução em uso por uma nova, diariamente ou semanalmente (para trabalhos de pequeno porte, em laboratório).
- C. Formule a solução com suprimento de nitrogênio em duas formas inorgânicas: NH_4^+ e NO_3^- . A amônia, ao ser removida pela planta, será substituída por H^+ e o nitrato, por OH^- , desacelerando as mudanças no pH. Ocorrerá também a formação de hidróxido de amônia, que agirá como tampão, por ser fracamente ionizado.

OBSERVAÇÃO

- Em estudos para a avaliação de crescimento de plântulas em laboratório, a solução é colocada em recipientes de 1-2 L, com aeração proporcionada por compressor de aquário. O nível da solução no recipiente é marcado com tinta permanente e diariamente completado com água destilada.

18.7. Hoagland Modificada

- São comuns alterações no método de Hoagland. Por exemplo, em estudos de choque osmótico em *Cucurbita pepo* L., *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Vigna mungo* L., *Phaseolus vulgaris* L. e *Pisum sativum* L. (Passos, 1989), foi usada a adaptação apresentada na tabela 8.

TABELA 8. Solução de Hoagland Meia-Força Modificada.

Solução-estoque	Composto	Concentração	Quantidade (g.L ⁻¹)	Volume necessário para 20 litros (mL)
A	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,5 M	354,15	20
B	KNO ₃	1,0 M	101,10	20
C	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 M	246,40	20
D	KH ₂ PO ₄	1,0 M	136,10	20
E	K ₂ HPO ₄	1,0 M	228,20	20
I Micromix™	Microelementos	Composto		20
		CuCl ₂ .2H ₂ O	0,075	
		H ₃ BO ₃	3,750	
		MoO ₃	0,075	
		MnCl ₂ .4H ₂ O	2,250	
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,330	
J Chel 138 Geigy™	Quelato de Fe		0,015	0,30 g adicionados ao volume final

18.8. Referências Bibliográficas

- FRITZ, G.J. Mineral nutrition. In: NOGGLE, G.R.; FRITZ, G.J. eds. **Introductory plant physiology**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1983. p.224-257.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: University of California Agricultural Experiment Station, 1938. 34p. (Circular, 347).
- JACOBSON, L. Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate. **Plant Physiology**, Rockville, v.26, p.411-413, 1951.

ROSS, C.W. **Plant physiology laboratory manual**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1974. 200 p.

PASSOS, L.P. **Growth and water status responses of mung bean (*Vigna mungo* L.) and other dicot species to osmotic stress**. Tucson: University of Arizona, 1989. 108 p. Dissertação de Doutorado.

STEINER, A.A.; VAN WINDEN, H. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v.26, p.862-863, 1970.

19. XILEMA - ANÁLISE DA EXSUDAÇÃO

CUIDADOS

- As lâminas de vidro devem estar absolutamente limpas.
- Cuidado para não contaminar os reagentes uns com os outros.
- Procure colocar as cinco gotas sempre na mesma ordem e em posições similares entre placas, para facilitar as comparações entre fotos.

19.1. Introdução

É possível que cultivares de uma mesma espécie, ou tratamentos distintos de um experimento, difiram no teor iônico da seiva no xilema, como decorrência de diferenças no potencial de absorção iônica. Neste capítulo, é descrita uma técnica (adaptada de Ross, 1974) para a análise da composição iônica da exsudação do xilema. A partir da comparação com o controle, notas poderão ser dadas a cada cultivar ou tratamento.

19.2. Procedimento

- A. Coloque o vaso com a planta a ser analisada sobre uma bandeja de plástico com água. O solo deve ser mantido úmido até que a exsudação tenha sido coletada.
- B. Corte o caule da planta herbácea a ser estudada (recentemente adubada) cerca de 20 cm acima do nível do solo.
- C. Conecte um tubo flexível de látex (de cerca de 7 cm de comprimento) à ponta do caule e amarre-o firmemente.
- D. Introduza um tubo capilar de vidro, parede grossa (de cerca de 25 cm de comprimento, dobrado em forma de U - 7 + 10 + 8 cm), na extremidade do tubo de látex, de maneira a obter uma conexão hermética (amarre com arame, caso necessário - vide figura 7).
- E. Introduza a outra extremidade do tubo capilar em um cilindro graduado de 10 mL e feche, hermeticamente, a boca do conjunto cilindro-capilaridade de vidro com *Parafilm* ou filme plástico. Dessa forma, a exsudação do xilema será coletada no cilindro graduado sem que haja evaporação suficiente para causar mudanças substanciais em sua concentração.
- F. Registre o volume da exsudação coletada no cilindro, após 48 h.
- G. Coloque em uma lâmina de vidro para microscópio, separadamente, uma gota de cada uma das seguintes soluções aquosas:
 - a) $MgCl_2$ 0,2 M
 - b) K_2SO_4 0,2 M
 - c) Na_2HPO_4 0,2 M
 - d) $CaCl_2$ 0,2 M
 - e) $Ca(NO_3)_2$ 0,2 M
- H. Coloque 400 μ L do reagente de magnésio em (a). Um precipitado de $NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$ se formará, indicando resultado positivo para íons de **magnésio**.
- I. Coloque 400 μ L da solução $BaCl_2$ 0,2 M em (b). Um precipitado branco (K_2SO_4) indicará a presença de íons de **sulfato**.

- J. Coloque 400 μL do reagente de molibdato de amônio em (c). A formação de precipitado amarelo, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$, indicará a presença de **fosfato**.
- K. Coloque 400 μL de ácido sulfúrico 1M em (d). Um precipitado branco, CaSO_4 , indicará a presença de **cálcio**.
- L. Coloque 400 μL do reagente de nitrato em (e). Uma coloração azul ou púrpura indicará a presença de íons de **nitrato**.
- M. **Fotografe as cinco gotas na placa.**
- N. Transfira 1 mL da exsudação do xilema para outra lâmina de vidro para microscópio e repita os passos de H. a M. Observe os resultados com cuidado, pois as intensidades serão bem menores que nos controles. Registre a presença ou ausência de reações.
- O. Fotografe a placa. Por último, compare as fotografias do controle e da exsudação.

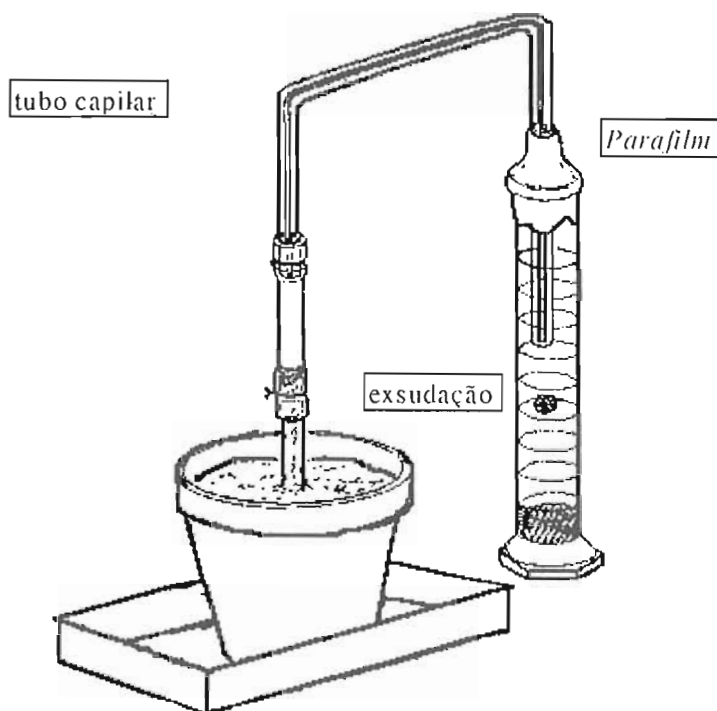


Figura 7. Montagem experimental para coleta de exsudação do xilema (adaptado de Ross, 1974).

19.3. Reagentes

Reagente de Magnésio	Dissolva 30 g de NH_4Cl , 0,1 g de Na_3PO_4 e 2,5 mL de NH_4OH em H_2O , completando o volume para 100 mL.
Reagente de Molibdato de Amônio	Dissolva 15 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água e adicione esta solução a 100 mL de uma solução aquosa com 46,5 mL de HNO_3 concentrado. Espere a suspensão decantar e use o sobrenadante.
Reagente de Nitrato	Dissolva 1 g de difenilamina em 100 mL de H_2SO_4 concentrado.

19.4. Testes Adicionais

- Molhe um círculo (0,7 cm de diâmetro) de papel-filtro tipo Whatman N° 1 ou 2 com uma alíquota da exsudação (verifique o volume necessário) e meça o potencial osmótico em osmômetro ou câmara psicrométrica de termopar.
- Coloque 400 µL da exsudação em um pedaço de papel de filtro, espere até secar, e aplique sobre ela um *spray* de solução de ninidrina a 0,3% (p/v) em etanol 95% (v/v). Aqueça o papel com a amostra na capela, para evaporar o etanol e acelerar a reação. Uma coloração púrpura indicará a presença de **aminoácidos** ou **amidas** na exsudação.

19.5. Método da Pressurização para a Coleta da Exsudação do Xilema

- Este método foi desenvolvido por Else et al. (1995), para a coleta de seiva em *Lycopersicon esculentum* Hill.
 - A. Faça a decapitação das plantas pouco abaixo do nó dos cotilédones, com lâmina bem afiada.
 - B. Introduza, imediatamente, a porção remanescente do caule em um tubo de látex de 20 mm de comprimento.
 - C. Tape a extremidade do tubo com uma rolha de borracha, contendo perfuração central, pela qual passa um tubo de silicone (1 mm d.i.) de 70 mm de comprimento. Conecte o tubo de silicone a uma torneira de três saídas e conecte esta a uma seringa hipodérmica de $5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$.
 - D. Coloque a montagem experimental dentro de uma câmara de pressão, especificamente adaptada para coletar a seiva expressa do corte no caule.
 - E. Use ar comprimido ou N_2 livre de O_2 para pressurizar (0,02-0,4 MPa) o sistema radicular, em amplitude de fluxos que inclua a taxa de transpiração de plantas inteiras e intactas.
 - F. Colete a seiva, a cada pressão aplicada, por 10 min, em tubos de microcentrífuga (1,5 mL).
 - G. Descarte os 200 mm^3 iniciais da exsudação, para evitar contaminação.
 - H. Pese imediatamente as amostras da exsudação e as congele (-20°C), para posterior análise.

19.6. Referências Bibliográficas

ELSE, M.A.; HALL, K.C.; ARNOLD, G.M.; DAVIES, W.J.; JACKSON, M.B. Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants. Accounting for effects of xylem sap flow rate on concentration and delivery. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.377-384, 1995.

ROSS, C.W. **Plant physiology laboratory manual**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1974. 200 p.

20. PULSO DE CALOR

CUIDADOS

- Mantenha a fonte de calor (ponta do fio proveniente da fonte de energia) a, no mínimo, 20 mm de distância da microsonda.
- Flutuações térmicas em volta da microsonda podem ser minimizadas pelo uso de fita isolante em volta do conjunto microsonda-folha, com cuidado para não causar dano ao tecido.
- A transpiração pode ser regulada pelo ajuste da intensidade luminosa na câmara, ou pela adição de soluções osmóticas moderadas (NaCl ou PEG) ao meio de cultivo.

20.1. Introdução

A técnica do pulso de calor possui muitas aplicações e uma das mais importantes é a determinação das rotas de fluxo hídrico em tecidos vegetais. O pulso de calor pode ainda ser usado para examinar as relações entre o fluxo da seiva nos tecidos e a taxa de transpiração (espera-se uma relação linear positiva), assim como suas variações diurnas e dependência com relação à densidade de plantas e luminosidade incidente. Tatenò (1985) verificou valores de velocidade do fluxo de seiva entre 0,1 e 11 cm.h⁻¹, para variações correspondentes na transpiração, da ordem de 3 a 16 mg H₂O.dm⁻¹.min⁻¹, em *Echinochloa utilis* Ohwi et Yabuno, *Sorghum bicolor* L. Moench e *Zea mays* L.

O objetivo deste capítulo é apresentar uma descrição do método de pulso de calor, pelo qual as plantas a serem estudadas devem ser cultivadas em condições controladas, em virtude da necessidade de se regular a temperatura e a transpiração.

20.2. Procedimento

- Esse método foi empregado por Rayan & Matsuda (1988) em plântulas de cevada com cinco dias de idade, cultivadas a 25-28°C, sob dois regimes de luminosidade: 200 e 400 μmol.m⁻².s⁻¹.
- A. Posicione uma microsonda de termopar, conectada a um termômetro digital, na base da primeira folha a uma distância conhecida (25 a 45 mm) do ponto de ligação com a semente.
 - B. Aplique pulsos de calor (0,2 s), gerados por uma fonte de energia de 16 V e 2 A DC.
 - C. A corrente geradora do pulso de calor é passada por um fio de 0,3 mm d.e. e 100 mm de comprimento, o qual é dobrado de forma a envolver o limbo foliar, ficando de 2 a 3 mm distante da superfície foliar. Geralmente, o fio *enrolado* é posicionado no limbo já expandido, de 20 a 30 mm acima da microsonda.

OBSERVAÇÃO

- Esse pulso não causa danos e proporciona um aumento instantâneo de 10,0°C na região em que é aplicado. Subseqüentemente, um aumento de temperatura da ordem de até 1,5°C é detectado a 10 mm (ou mais) de distância.

D. Monitore as velocidades de transferência de calor, com base em incrementos de 0,1°C na temperatura.

20.3. Referências Bibliográficas

RAYAN, A.; MATSUDA, K. The relation of anatomy to water movement and cellular response in young barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.87, p.853-858, 1988.

TATENO, K. A measurement of the sap-flow velocity using the heat pulse method in several forage crops. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS. 15., 1985, Kyoto **Proceedings...** Tochigi: Japanese Society for Grassland Science, 1985. p.345-346.

21. POTENCIAL IÔNICO DA MEMBRANA CELULAR - DETERMINAÇÃO

21.1. Introdução

A fisiologia dos estômatos possui a característica singular da acumulação e perda de solutos inorgânicos (normalmente, potássio e cloro) nas duas células que circundam a cavidade dos estômatos (células-guardas). Visto que estas células não possuem *plasmodesmata* funcionais, as mudanças de concentração envolvem o transporte iônico através da membrana celular. Existe hoje um consenso de que essas membranas possuem uma bomba de extrusão de prótons (H^+ -ATPase), capaz de gerar um potencial elétrico para a difusão de K^+ na célula (Zeiger, 1983).

Portanto, avaliações do potencial iônico da membrana celular são relevantes para caracterizar a fisiologia dos estômatos de uma espécie. Neste capítulo, é apresentado o método proposto por Blatt (1987) para substanciar o conceito de que apenas a difusão de K^+ (ou bombeamento de H^+) pode explicar as mudanças nos níveis de K^+ nas células-guardas de folhas de *Vicia faba* L.

A abordagem descrita é também válida para comparar as propriedades elétricas das células-guardas de uma espécie àquelas de outras espécies, já conhecidas: verificar a seletividade iônica das células (ex. seletividade para K^+ em detrimento do Na^+ - razão de permeabilidade P_{Na}/P_K); verificar a resposta ao pH externo (na faixa 4,5-7,4) e examinar a resposta ao Ca^{++} e ao CO_2 . Essas avaliações são relevantes para a elucidação do mecanismo primário de transporte de carga elétrica na membrana citoplasmática das células-guardas e para o próprio entendimento dos mecanismos de transporte de K^+ durante os movimentos dos estômatos.

21.2. Cultivo das Plantas e Preparo do Tecido

- A. Cultive as plantas em solução nutritiva aerada, sob 16 h de luz: 8 h de escuro. Use iluminação artificial de lâmpadas fluorescentes de 50 W tipo *Cool White* e *Grolux* e lâmpadas incandescentes de 60 W (PAR de $0,4 \text{ mmol.m}^{-2}$). Mantenha a temperatura a $16-20^\circ\text{C}$.
- B. Colete as folhas mais jovens, já totalmente expandidas, de plantas com 3-6 semanas de idade, no início do período luminoso.
- C. Remova tiras da epiderme foliar abaxial, as quais serão os tecidos a serem estudados.
- D. Coloque o tecido, com a superfície da cutícula para cima (sob iluminação ambiente), em tampão Ca^{++} -HEPES 5 mM, KCl 1 mM, pH 7,4 ($Ca^{++} = 1 \text{ mM}$), por 1-2 h, antes de montá-lo na câmara experimental.

21.3. Câmara Experimental

- A. Monitore todas as operações em microscópio, sob magnificação 400 X e iluminação de campo brilhante (lâmpada 16 W de tungstênio-halogênio), com filtro de calor de 4 mm tipo KG1. Não há necessidade de se controlar a luz de fundo, a não ser durante as medições da abertura dos estômatos. Nesse caso, use gaiola de Faraday e filtro de interferência (meio-comprimento de onda, 23 nm, luz incidente de, aproximadamente, $2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a 554 nm). Esse procedimento minimizará a exposição aos comprimentos de onda azul e vermelho, durante os breves períodos de coleta de dados.
- B. Conduza as penetrações dos microeletrodos e medições de abertura dos estômatos com o tecido montado em uma câmara retangular de $35 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$, a ser construída da seguinte forma:
 - a) Afixe um bloco de aço inoxidável em cada extremidade de uma lâmina (de vidro) de microscópio.

- b) Coloque uma única tira de epiderme, com a cutícula virada para baixo, em uma lamínula de vidro de 18 x 3 mm².
- c) Encaixe o conjunto lamínula-tira de epiderme entre os dois blocos de aço inoxidável na lâmina de microscópio, no sentido do maior comprimento, por sobre pedaços de lâmina de microscópio (de vidro, cada qual com 2 mm²), e fixe-o com parafina, nos dois pontos de contato com os blocos.
- d) Coloque um pedaço de lamínula de vidro de 50 x 50 mm² no topo dos dois blocos de aço, cobrindo o espaço remanescente. Esta será a cobertura da câmara, deixando duas aberturas, para se ter acesso à amostra. Esta montagem pode ser feita em 30 s.
- e) Mantenha o tecido coberto por 300 µL da solução Ca⁺⁺-HEPES, KCl, durante o estudo.
- f) Complete o volume da câmara com solução e fixe-a a uma armação de suporte com isolamento elétrico, a qual seja encaixável no carro (*stage* mecânico) do microscópio.
- C. Monte o conjunto lamínula-tecido em um ângulo de, aproximadamente, 55° com relação ao eixo ótico do microscópio.
- D. Conduza as medições de abertura dos estômatos com o tecido colocado horizontalmente (posição normal, com relação ao eixo ótico).
- E. Introduza as soluções de banho pela abertura frontal, por meio de uma seringa com agulha, tanto para a penetração do microeletrodo quanto para a medição da abertura dos estômatos. Faça a remoção dessas soluções pela abertura oposta, por aspiração. O ideal é manter um fluxo contínuo, enquanto o experimento durar. Ajuste a vazão do fluxo para cerca de 5 mL.min⁻¹ (ou seja, 10 volumes da câmara por minuto).
- F. Efetue as manipulações com um micromanipulador, no qual as sondas do pré-amplificador já estejam encaixadas.
- G. Afixe, para prevenir interferências, o conjunto microscópio-micromanipulador sobre uma mesa de flutuação a gás, de maneira que os eletrodos possam ser inseridos na câmara de um lado que esteja normal ao eixo ótico. Coloque o aparato inteiro em uma gaiola de Faraday.

21.4. Microeletrodos

- A. Prepare os microeletrodos no aparato próprio (*microelectrode puller*), a partir de tubos capilares de borossilicato de seção transversal triangular (1,2 mm altura, 0,25 mm espessura) ou circular com fibra interna para enchimento (1 mm d.e., 0,59 mm d.i.). Observe que, em todas as penetrações, serão empregados microeletrodos de cilindro duplo, conforme Blatt & Slayman (1983).
- B. Substitua o pino do torno por um grampo movido por mola e motor DC, acionado a 20 rpm, e insira um interruptor manual no circuito solenóide.
- C. Confeccione os microeletrodos a partir de pares de tubos capilares, da seguinte maneira:
- Abra o circuito solenóide do *puller*, aqueça o vidro, torça o par em 360° e deixe esfriar.
 - Reconecte o circuito solenóide e inicie outro ciclo. Separe os cilindros dos microeletrodos atrás da haste, por meio de aquecimento em uma pequena chama de gás.

OBSERVAÇÃO

- Os diâmetros das pontas serão menores que 0,4 µm (confira, por inspeção a 1.000 X). A resistência dos microeletrodos, em solução KCl 1 M, deverá estar entre 40 e 70 Mohm.

- D. Complete os volumes dos microeletrodos com solução de cloreto de potássio (0,1, 1 ou 3 M), sulfato de potássio 0,1 M ou acetato de potássio 50 ou 200 mM (esta última preparada por titulação de solução de ácido acético com KOH, até atingir-se pH 7,2).

21.5. Eletrônica

- A. Conecte os cilindros dos microeletrodos, via meias-células de KCl | Ag-AgCl 1 M, às entradas de dois amplificadores eletrônicos (impedância de entrada maior que $2 \cdot 10^{12}$ ohm), equipados com circuitos de ponte e alça para passagem da corrente.
- B. Empregue uma ponte KCl-ágar 1 M e meia-célula adaptável KCl | Ag-AgCl 1 M como banho para o microeletrodo, o qual deve ser inserido na câmara experimental a favor da corrente da solução.
- C. Monitore a corrente no sinal de tensão do amplificador. A passagem de corrente deverá ser independente da resistência do eletrodo e não precisará ser retificada (verifique a passagem de corrente, ocasionalmente, com um conversor de corrente para tensão, com *terra* virtual).
- D. Meça a resistência de entrada, usando um ou dois microeletrodos. Use um microeletrodo para passar a corrente e ambos para medir a tensão. Blatt (1987) recomenda esse procedimento para evitar problemas em razão de mudanças na resistência da ponte do microeletrodo durante penetrações com o uso apenas de um microeletrodo.
- E. Faça medições com os grampos de tensão e de corrente para obter o valor de R_{in} . Em medições de potencial livre (sem penetração), a tensão não deverá ultrapassar 30 mV. Use o grampo de corrente para aplicar pulsos de corrente bipolar de 0,5-1,0 s de duração, a intervalos de 8-10 s. Valores deverão oscilar em torno de 20 pA.

OBSERVAÇÃO

- Os dados dos grampos de corrente e de tensão poderão ser transferidos para um computador, desde que equipado com um conversor de 30 kHz analógico → digital e dois conversores digital → analógico. Os dados poderão ser manipulados por um programa multitarefa. Como alternativa, os valores de corrente e tensão poderão ser exibidos em osciloscópio e registrados em registrador de cartela com duas canetas.
- Espera-se que os potenciais livres (ou seja, os potenciais nas pontas dos microeletrodos) medidos antes e após cada penetração não difiram em mais de 5 mV. Medições que resultem em diferenças maiores devem ser descartadas.
- O potencial da célula-guarda é a diferença entre o valor medido na célula e o circuito terra.

- F. Calcule a condutância específica (G_m) e a resistência (R_m) da área da superfície celular (A), a qual é obtida pela medição das dimensões das células-guardas com um micrômetro ocular. Assumindo que a distribuição de corrente é uniforme, use a seguinte expressão:

$$G_m = \frac{1}{R_m} = \frac{1}{R_{in} \cdot A} = \frac{I_c}{\Delta V_m \cdot \pi \cdot d \cdot l}$$

Em que:

ΔV_m = tensão obtida com a medição do potencial livre

I_c = corrente do grampo de corrente

d, l = dimensões ortogonais da célula (d = diâmetro e l = comprimento)

21.6. Experimentação

- A. Registre o diâmetro, comprimento, volume e volume vacuolar (%) das células-guardas.
- B. Efetue a penetração do microeletrodo na célula-guarda, da seguinte maneira: avance o microeletrodo horizontalmente na célula-guarda escolhida, certificando-se de que esteja em foco na ocular do microscópio. A penetração estará bem feita quando a superfície celular inicialmente ceder à pressão da ponta do microeletrodo e, depois, repentinamente, voltar à posição original, na medida em que a ponta estiver penetrando. **O tubo capilar triangular é melhor do que o cilíndrico para esse tipo de trabalho.**

OBSERVAÇÃO

- Apesar da resolução do microscópio não permitir a visualização de onde a ponta do microeletrodo realmente está (membrana, citoplasma ou vacúolo), o contato elétrico com a superfície celular (caracterizado por uma mudança negativa no potencial) ocorre antes da penetração, quando a ponta do microeletrodo atinge uma proximidade de cerca de 1,0 μm da célula.
- **Assume-se que a membrana celular domina as propriedades elétricas da célula, independente da localização da ponta do microeletrodo.**
- A duração de cada penetração pode variar de 40 a 60 min, sendo terminada pelo operador.
- A passagem da ponta do microeletrodo pela célula é caracterizada por uma queda brusca no potencial da membrana (ou seja, mudança para um valor menos negativo).
- Em *V. faba*, o enchimento dos microeletrodos com soluções convencionais (KCl 1-3 M), em células banhadas com KCl 0,1 mM, Ca^{++} 1 mM, pH 7,4, ocasiona uma redução no potencial medido, em 2-5 min, para cerca de -30 mV, e da resistência para menos de 0,2 kohm.cm⁻². Em contraste, células penetradas com microeletrodos que contêm K⁺-acetato 50-200 mM geram valores próximos a -180 mV (potencial) e 16 kohm.cm⁻² (resistência). Essas reduções são atribuídas à ocorrência de vazamento de Cl⁻ dos microeletrodos (causado pelo Ca^{++} das soluções externas), quando a concentração de KCl da solução de enchimento é elevada.

21.7. Referências Bibliográficas

- BLATT, M.R. Electrical characteristics of stomatal guard cells: the ionic basis of the membrane potential and the consequence of potassium chloride leakage from microelectrodes. *Planta*, Berlin, v.170, p.272-287, 1987.
- BLATT, M.R.; SLAYMAN, C.L. KCl leakage from microelectrodes and its impact on the membrane parameters of a nonexcitable cell. *Journal of Membrane Biology*, Berlin, v.72, p.223-234, 1983.
- ZEIGER, E. The biology of stomatal guard cells. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.34, p.441-475, 1983.

22. TRANSPIRAÇÃO

CUIDADOS

- A transpiração é afetada por numerosas variáveis ambientais e biológicas, dificultando sobremaneira a reprodução de dados, mesmo em condições experimentais similares.

22.1. Introdução

A absorção e o fluxo de água nas plantas são regulados por um gradiente de ψ , o qual é proveniente de um déficit hídrico nas folhas. Esse déficit é causado pela diferença entre a água transpirada e a absorvida, evidenciando a importância de se conhecer a transpiração.

Existem numerosas abordagens para se estimar a abertura dos estômatos e a taxa de transpiração, cada qual com vantagens e desvantagens (vide revisões de Slavik 1974 e Meidner 1981). Para considerações teóricas visando à construção de porômetros, vide Parkinson (1985).

Existem duas grandes categorias para a medição da taxa transpiratória: microscopia e condutância. A primeira tem a vantagem de permitir micrografias, mas é muito afetada pela excisão e subsequente manuseio das amostras. A segunda engloba as determinações *in situ* (ex. porômetros) e apresenta o benefício de medir, quantitativamente, a condutância coletiva de milhares de estômatos em tecidos intactos.

As técnicas porométricas baseiam-se na passagem de gases através do tecido ou na saída de vapor d'água da folha, por difusão ou pressão artificial. Os porômetros de *transpiração* e os de *difusão* dinâmica, por serem aplicáveis a tecidos intactos, são os mais usados.

Os porômetros de transpiração medem a quantidade de vapor d'água liberada por unidade de área foliar por unidade de tempo. Existem dois diferentes princípios: (a) o nível de vapor d'água é medido na corrente de ar que passa pela folha, a uma dada U.R., e (b) *difusão em fluxo contínuo de estado estável*: a corrente de ar é ajustada para manter a densidade de vapor constante, em um nível determinado (Beardsell et al. 1972 e Bingham & Coyne 1977). A folha deve ser isolada em uma câmara e exposta a uma corrente de ar seco. Adicionalmente, existem versões em que a câmara é confeccionada em dimensões suficientes para medir a transpiração de plantas inteiras, ou de dosséis (ex. Daley et al., 1984). Em oposição à sua precisão, a calibração dessa classe de aparelhos em unidades de resistência ou condutância é muito complexa, requerendo aparelhagem sofisticada. Câmaras permutáveis permitem o estudo de folhas de diferentes formatos e tamanhos.

Os porômetros de difusão dinâmica possuem uma câmara com sensor de umidade, a qual é selada na superfície foliar. Nos modelos mais recentes, o equilíbrio com o tecido é atingido a partir da umidade existente (em vez de passagem de ar seco). A umidade da câmara aumenta, devido à transpiração, e o tempo gasto para alterar essa umidade em uma quantidade fixa é registrado. Alguns modelos possuem operação automática, com *ciclagem* repetitiva de secagem/umidificação. Esses aparelhos requerem calibrações periódicas, empregando-se cartão perfurado com poros de diâmetros variados. A câmara do cabeçote do sensor pode ser usada em folhas de variados formatos e tamanhos.

Alguns modelos atuais de porômetros de difusão, tanto em fluxo contínuo de estado estável quanto dinâmica, incorporam facilidades, tais como microprocessador, para cálculos imediatos e armazenagem de dados e interface para impressora ou computador. Além disso, por serem portáteis e terem bateria recarregável, propiciam rápidas medições *in situ* em áreas experimentais.

Neste capítulo são descritos os seguintes aparatos para a medição da taxa transpiratória: potômetro, lisímetro de pesagem, porômetro de estado estável e porômetro de difusão dinâmica. A condutância estomática pode também ser determinada por medidores de FS (capítulo 28).

22.2. Potômetro

- O potômetro é um artefato simples que mede a absorção de água pela planta. Se assumirmos que não existe água de reserva nos tecidos e que não ocorre expansão celular (pressupostos relativamente válidos para intervalos de poucas horas), a absorção e a perda de água serão equivalentes. Determinado-se a perda de água, a área foliar total e o gradiente hídrico, é possível calcular a resistência total à perda de água. O uso de plantas cultivadas em solução nutritiva permite a obtenção de sistemas fechados.
- A. Conecte a extremidade de um tubo de látex ao braço lateral de um frasco *kitazato*.
 - B. Coloque água desaerada no frasco, gradualmente, até formação de corrente.
 - C. Feche a extremidade livre do tubo com um grampo. Complete o restante do volume do frasco com água, até o topo.
 - D. Remova uma planta da solução nutritiva e, muito cuidadosamente, introduza suas raízes na boca do frasco, evitando lesões aos tecidos. Prenda o frasco a um suporte.
 - E. Fure o centro de uma rolha de borracha adaptável ao frasco e corte-a em duas partes iguais. Cubra as duas metades com vaselina, junte-as e tape o frasco, colocando o caule da planta no orifício central da rolha. **Não deixe formar bolhas na água.** Dessa forma, as raízes ficarão presas e o sistema radicular isolado do ambiente externo.
 - F. Empurre a rolha, para obter uma selagem firme, e prenda-a ao frasco, com uma braçadeira.
 - G. Conecte a extremidade livre do tubo de látex (que está com o grampo) à extremidade maior de uma pipeta de 1 mL. Posicionando a pipeta com a ponta virada para cima, prenda-a, com braçadeira, ao suporte.
 - H. Remova o grampo do tubo de látex. Insira a agulha de uma seringa com água na porção do tubo de látex que está com água e injete, até a água atingir a borda (ponta da pipeta). **A seringa não pode conter bolhas de ar.**
 - I. Coloque vaselina nas regiões perfuradas, para impedir vazamentos no orifício feito com a agulha. Inspeccione toda a montagem quanto a vazamentos.
 - J. Anote o volume de água perdido por unidade de tempo, verificando a posição do menisco na pipeta. Se o menisco descer muito, faça novo enchimento com a seringa, conforme descrito.
 - K. Anote dados até que um estado estável de absorção hídrica seja observado.
 - L. Registre a temperatura da folha com sonda de termopar e a U.R., durante o experimento.
 - M. Determine a área foliar total (ex. desenhando os limbos em papel milimetrado).
 - N. Calcule a quantidade (mg) de água perdida por cm^2 por s, a partir dos dados de absorção de água e área foliar. Esta é a taxa de transpiração por unidade de área.

OBSERVAÇÃO

- Para determinar a resistência dos estômatos, é necessário conhecer o gradiente de concentração que força a saída da água. A tabela 9 apresenta a umidade absoluta do ar sob variadas temperaturas e valores de U.R. Visto que o ar na câmara subestomática está saturado com água, a umidade absoluta será equivalente àquela do ar a 100% de U.R., a uma dada temperatura da folha.

TABELA 9. Umidade absoluta (concentração real de água) do ar ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) em vários níveis de U.R. e temperatura (T).

T (°C).	Umidade Relativa (U.R.)									
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
0	0,485	0,969	1,454	1,938	2,423	2,908	3,392	3,877	4,361	4,846
1	0,519	1,038	1,557	2,076	2,596	3,115	3,634	4,153	4,672	5,191
2	0,556	1,111	1,667	2,223	2,779	3,334	3,890	4,446	5,001	5,557
3	0,595	1,189	1,784	2,378	2,973	3,567	4,162	4,756	5,351	5,945
4	0,636	1,272	1,907	2,543	3,179	3,815	4,451	5,086	5,722	6,358
5	0,680	1,359	2,039	2,718	3,398	4,077	4,757	5,436	6,116	6,795
6	0,726	1,451	2,177	2,903	3,629	4,354	5,080	5,806	6,531	7,257
7	0,775	1,549	2,324	3,099	3,874	4,648	5,423	6,198	6,972	7,747
8	0,827	1,653	2,480	3,307	4,134	4,960	5,787	6,614	7,440	8,267
9	0,882	1,763	2,645	3,526	4,408	5,290	6,171	7,053	7,934	8,816
10	0,940	1,879	2,819	3,758	4,698	5,638	6,577	7,517	8,456	9,396
11	1,00	2,00	3,00	4,00	5,01	6,01	7,01	8,01	9,01	10,01
12	1,07	2,13	3,20	4,26	5,33	6,40	7,46	8,53	9,59	10,66
13	1,13	2,27	3,40	4,54	5,67	6,80	7,94	9,07	10,21	11,34
14	1,21	2,41	3,62	4,82	6,03	7,24	8,44	9,65	10,85	12,06
15	1,28	2,56	3,85	5,13	6,41	7,69	8,97	10,26	11,54	12,82
16	1,36	2,73	4,09	5,45	6,82	8,18	9,54	10,90	12,27	13,63
17	1,45	2,89	4,34	5,79	7,24	8,68	10,13	11,58	13,02	14,47
18	1,54	3,07	4,61	6,14	7,68	9,22	10,75	12,29	13,82	15,36
19	1,63	3,26	4,89	6,52	8,15	9,78	11,41	13,04	14,67	16,30
20	1,73	3,46	5,19	6,92	8,65	10,37	12,10	13,83	15,56	17,29
21	1,83	3,67	5,50	7,33	9,17	11,00	12,83	14,66	16,50	18,33
22	1,94	3,88	5,83	7,77	9,71	11,65	13,59	15,54	17,48	19,42
23	2,06	4,11	6,17	8,22	10,28	12,34	14,39	16,45	18,50	20,56
24	2,18	4,35	6,53	8,71	10,89	13,06	15,24	17,42	19,59	21,77
25	2,30	4,61	6,91	9,22	11,52	13,82	16,13	18,43	20,74	23,04
26	2,44	4,87	7,31	9,75	12,19	14,62	17,06	19,50	21,93	24,37
27	2,58	5,15	7,73	10,30	12,38	15,46	18,03	20,61	23,18	25,76
28	2,72	5,45	8,17	10,89	13,62	16,34	19,06	21,78	24,51	27,23
29	2,88	5,75	8,63	11,50	14,38	17,26	20,13	23,01	25,88	28,76
30	3,04	6,07	9,11	12,14	15,18	18,22	21,25	24,29	27,32	30,36
31	3,20	6,41	9,61	12,82	16,02	19,22	22,43	25,63	28,84	32,04
32	3,31	6,62	9,92	13,23	16,54	19,85	23,16	26,46	29,77	33,08
33	3,57	7,13	10,70	14,26	17,83	21,39	24,96	28,52	32,09	35,65
34	3,76	7,52	11,27	15,03	18,79	22,55	26,31	30,06	33,82	37,58
35	3,96	7,92	11,88	15,84	19,80	23,76	27,72	31,63	35,64	39,60
36	4,17	8,34	12,51	16,68	20,86	25,03	29,20	33,37	37,54	41,71
37	4,39	8,78	13,18	17,57	21,96	26,35	30,74	35,14	39,53	43,92
38	4,62	9,24	13,87	18,49	23,11	27,73	32,35	36,98	41,60	46,22
39	4,86	9,73	14,59	19,45	24,32	29,18	34,04	38,90	43,77	48,63
40	5,11	10,23	15,34	20,46	25,57	30,68	35,80	40,91	46,03	51,14

- P. Verifique, com base na temperatura do ar e na U.R., a umidade absoluta do ar na tabela 9. Calcule o gradiente de concentração (água no ar - água na câmara subestomática).
- Q. Determine a resistência à perda de água, com base na lei de Ohm, ou seja:

$$\text{Fluxo} = \text{gradiente/resistência}$$

$$\text{Transpiração (mg H}_2\text{O.cm}^{-2}\text{.s}^{-1}) = \text{concentração (mg.cm}^{-3})/\text{resistência (s.cm}^{-1})$$

22.3. Lisímetro de Pesagem (Van Ieperen & Madery, 1994)

- As medições se baseiam em registros contínuos de peso de dois vasos comunicantes, completados com solução nutritiva. Os vasos são cilíndricos e possuem peso idêntico. A planta é colocada no vaso 1 e apoiada por uma armação rígida de três tubos de plástico (1 cm de diâmetro), com alguns tubos cruzados, os quais são fixados ao vaso. As raízes são mergulhadas em solução nutritiva aerada. O vaso 1 é então colocado na balança 1 e o vaso 2 na balança 2, conforme a figura 8.
- Os vasos são interconectados por tubo de silicone, sem afetar as balanças. Ambos os vasos são vedados com lâmina de alumínio, para prevenir evaporação do conteúdo. A montagem, exceto a armação rígida e a planta, são colocadas em caixa de poliestireno, para minimizar os efeitos externos sobre as pesagens.

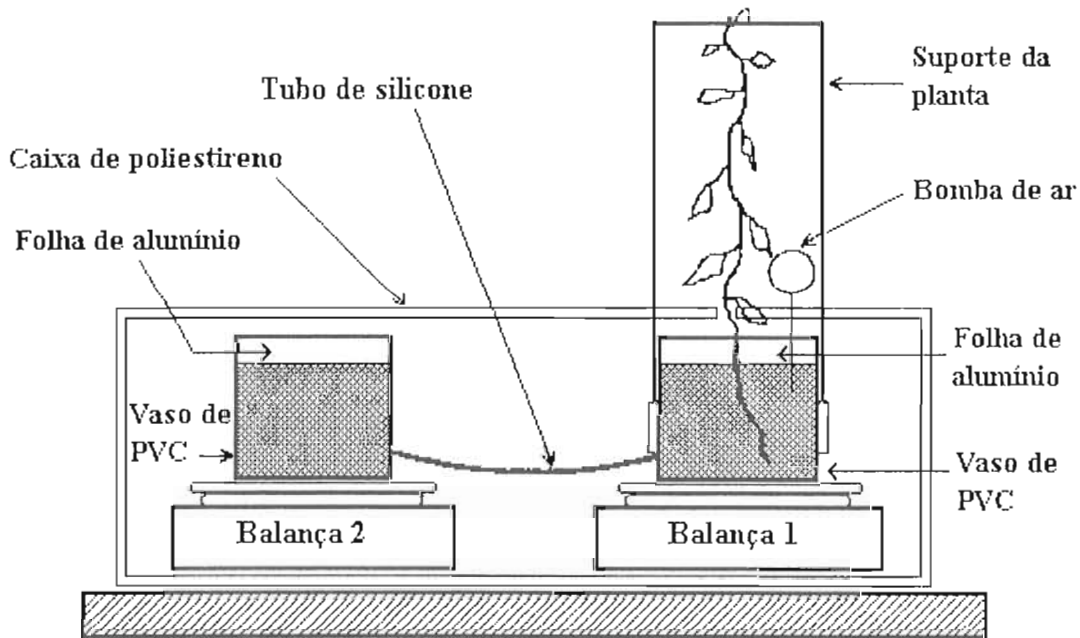


FIGURA 8. Montagem experimental para determinação simultânea das taxas de transpiração e absorção de água (adaptado de Van Ieperen & Madery, 1994).

A taxa de transpiração (E) é dada pela expressão:

$$E \text{ (g.min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta W_1 + \Delta W_2}{\Delta t}$$

A taxa de absorção de água (U) é dada pela expressão:

$$U \text{ (g.min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta W_2}{\Delta t \cdot V_s}$$

em que:

$$V_s = A_1 / A_2 + 1$$

W_1 = peso da balança 1 (g)

W_2 = peso da balança 2 (g)

t = tempo (min)

V_s = fator do vaso (sem unidade)

A_1 = área do vaso na balança 1 (m²)

A_2 = área do vaso na balança 2 (m²)

- Os vasos têm 21 cm d.i., volume de 6,5 L, e são interconectados por tubo de silicone (5 mm d.i., 20 cm de comprimento), sendo colocados sobre duas balanças de precisão. Os dados analógicos gerados pelas balanças são medidos por voltímetro, conectado a uma unidade de aquisição de dados. Em geral, os dados são coletados a uma taxa de 300 amostras por balança por minuto.

22.4. Porômetro de Difusão em Estado Estável

- A perda de água de uma folha colocada na cubeta é determinada pela medição da taxa de fluxo de ar seco necessário para manter a U.R. constante dentro da cubeta. Normalmente, a U.R. ambiente é usada como ponto de nulidade e o ar seco é injetado na cubeta, a uma vazão mínima necessária para balancear o fluxo de água da corrente transpiratória da folha. Esse expediente mantém a U.R. da cubeta no ponto selecionado. A resistência estomática, ou a condutância, é calculada diretamente dos valores medidos de U.R., temperatura (da folha e do ar) e de taxa de fluxo.
- Um medidor de fluxo de massa eletrônico é usado para medir a taxa de fluxo de ar seco dentro da cubeta. A umidade em estado estável dentro da cubeta é mantida, em regime semi-automático, por um sistema de retroalimentação que usa o medidor de fluxo de massa, a válvula de ajuste da nulidade e o controlador de fluxo automático interno. Para uma resistência estomática menor que 5 s.cm⁻¹, a medição pode ser feita em 5-15 s. Resistências mais elevadas acarretaram maiores tempos para as medições, tipicamente dentro da faixa de 60 s. O aparelho é fornecido com calibração de fábrica. No entanto, a calibração geral é recomendada anualmente e a calibração do sensor de umidade a cada seis meses, ou conforme necessário.

- Registre na memória do aparelho os valores da área de abertura e da pressão atmosférica.
- Registre na memória do aparelho a umidade do ponto de nulidade, a qual será a U.R. da cubeta, após o período de equilíbrio com as condições ambientais. Outros valores, diferentes do observado para o ambiente, podem ser lançados como ponto de nulidade. Esse passo pode ser eliminado em medições subsequentes, caso o mesmo ponto de nulidade venha a ser usado.

- C. Prenda a amostra na braçadeira do cabeçote do sensor. Use a válvula de ajuste da nulidade para colocar a taxa de fluxo dentro da amplitude dinâmica do controlador de fluxo automático interno. O nível de ajuste depende da resistência da amostra. Esse passo pode ser eliminado em medições subseqüentes, caso condições experimentais similares prevaleçam.
- D. Observe o indicador do medidor do ajuste de nulidade. Se o indicador estabilizou-se dentro da amplitude do medidor, isso indica que a cubeta equilibrou-se dentro da faixa escolhida pelo usuário. A leitura pode então ser feita.
- E. Exporte, opcionalmente, os dados para gravador ou computador. Armazene os parâmetros na memória do aparelho, para visualização no mostrador.
- F. Gire a válvula de ajuste da nulidade na direção indicada no medidor, caso o indicador não esteja na amplitude do medidor após vários segundos. Repita o procedimento até que o indicador se estabilize dentro da amplitude do medidor. Em seguida, a leitura poderá ser efetuada.
- G. Repita os passos de B. a E., conforme necessário.

22.5. Porômetro de Difusão Dinâmica (Monteith et al., 1988)

- Quando o cabeçote do sensor é preso à folha, uma pequena câmara (cubeta) é levemente pressionada contra a superfície foliar. A difusão de vapor d'água para fora da folha aumenta a umidade dentro da cubeta e o aparelho automaticamente cronometra o aumento na U.R., entre dois níveis eletronicamente predeterminados. Esses níveis podem ser ajustados e são, tipicamente, escolhidos próximos ao valor da U.R. ambiente, para minimizar distúrbios nos estômatos.
 - O tempo que a U.R. leva para mudar de um valor para outro é uma medida da taxa de perda de vapor d'água da superfície foliar. Essa leitura é então automaticamente convertida em resistência à difusão, ou condutância, conforme preferido pelo usuário.
- A. Verifique a memória, a bateria e o dessecante (tem de estar **azul** e não **vermelho**).
 - B. Acerte o relógio e o calendário. Mude o formato de registro dos dados, caso necessário.
 - C. Selecione o módulo de leitura. Coloque a folha no cabeçote.
 - D. Selecione o módulo de início. O aparelho efetua a leitura.
 - E. Aceite ou rejeite a leitura efetuada. Os dados podem ser revistos e exportados para impressora ou computador.
 - F. Adote o seguinte procedimento, sempre que o aparelho indicar que a calibração é necessária:
 - a) Prepare a placa de calibração, com a seguinte técnica:
 - a₁) Molhe o papel-filtro e remova o excesso de água com papel-toalha. Repita três vezes.
 - a₂) Coloque o papel-filtro na placa de calibração, cobrindo todos os orifícios de calibração.
 - a₃) Sele com fita adesiva, aparando os excessos de fita nas bordas.
 - a₄) Aperte a fita adesiva para remover bolhas de ar. Deixe equilibrar por 1 h.
 - a₅) Retorne a placa de calibração para a embalagem, até necessidade de uso (pode ficar armazenada até três dias). **CUIDADO! Não toque a placa com os dedos.**
 - a₆) Espere por 1 h. antes de calibrar.
 - a₇) Aceite erros menores que 5%.
 - b) Selecione o módulo de calibração. Ajuste a UR com relação ao meio ambiente.
 - c) Verifique outros módulos, tais como tipo de câmara de selagem, unidades de medição e pressão atmosférica.
 - d) Insira o retângulo de papel, previamente saturado de água, na placa de calibração. Antes de encaixá-lo, porém, remova o seu excesso de água.
 - e) Insira a placa de calibração na posição 1. Verifique se está bem encaixada e inicie a leitura.

- f) Espere até a leitura se estabilizar, para aceitá-la.
- g) Mova a placa para a próxima posição e repita o procedimento. Assim por diante, até todas as seis posições terem sido lidas.
- h) Selecione o módulo de ajuste a curva. O aparelho recalcula os resultados e estima o erro.
- i) Instale a calibração, se o erro for menor que 10%. Caso contrário, descarte a calibração e refaça o pior resultado até obter precisão.

22.6. Referências Bibliográficas

- BEARDSELL, M.F.; JARVIS, P.G.; DAVIDSON, B. A null-balance diffusion porometer suitable for use with leaves of many shapes. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.9, p.677-690, 1972.
- BINGHAM, G.E.; COYNE, P.I. A portable, temperature-controlled, steady-state porometer for field measurements of transpiration and photosynthesis. **Photosynthetica**, Prague, v.11, p.148-160, 1977.
- DALEY, P.F.; CLOUTIER, C.F.; McNEIL, J.N. A canopy porometer for photosynthesis studies in field crops. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.290-295, 1984.
- MEIDNER, H. Measurements of stomatal aperture and responses to stimuli. In: JARVIS, P.G.; MANSFIELD, T.A. eds. **Stomatal physiology**. London: Cambridge University Press, 1981. p.25-49.
- MONTEITH, J.L.; CAMPBELL, G.S.; POTTER, E.A. Theory and performance of a dynamic diffusion porometer. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v.44, p.27-38, 1988.
- PARKINSON, K.J. Porometry. In: MARSHALL, B.; WOODWARD, F.T. eds. **Instrumentation for environmental physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p.171-191.
- SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 308p.
- VAN IEPEREN, W.; MADERY, H. A new method to measure plant water uptake and transpiration simultaneously. **Journal of Experimental Botany**, London, v.45, p.51-60, 1994.

23. RELAÇÕES HÍDRICAS I - PSICROMETRIA DE TERMOPAR

CUIDADOS

- Manuseie as câmaras psicrométricas com cuidado. Choques físicos podem quebrar as junções do termopar.
- As amostras têm de ser do mesmo tamanho. Use furador para obter discos foliares e lâminas espaçadas por parafusos para obter seções padronizadas do caule ou da raiz.
- Os instrumentos usados para corte tem de estar limpos e secos.
- Procure trabalhar com rapidez, para evitar perda de água pelo tecido excisado.

23.1. Introdução

Toda fração aquosa de uma amostra perde água, quando colocada em ambiente seco e hermeticamente fechado, aumentando, conseqüentemente, a U.R. (ou pressão de vapor) daquele ambiente. Após um período de equilíbrio, a amostra e o ar da câmara onde a amostra está inserida apresentarão o mesmo ψ . Esta relação é usada para medir o ψ de amostras de plantas e de solos, por meio do psicrômetro de termopar.

Esse aparato (Neumann & Thurtell, 1972) mede a U.R. em equilíbrio com a amostra, pela determinação do ponto de orvalho ou do decréscimo na temperatura psicrométrica (ou seja, a diferença entre a temperatura do bulbo seco e a temperatura do bulbo úmido). No lugar de um termômetro, o aparelho possui um termopar (um fio feito de *chromel* e outro de *constantan*, conectados por duas junções, sendo uma dentro da câmara da amostra e a outra fora). A passagem de corrente pela junção, devido à diferença de condutividade elétrica entre as duas ligas, faz com que uma se esfrie mais depressa do que a outra. Quando a temperatura da junção fica menor que a do ar presente na câmara, ocorre condensação de vapor em sua superfície (efeito Peltier). A corrente é então interrompida pelo operador e o vapor que havia condensado começa a se evaporar, numa taxa proporcional à U.R. dentro da câmara. Esta última é determinada pelo ψ da amostra, a qual está em equilíbrio térmico com o ar da câmara. Quanto maior o ψ da amostra, mais lenta será a evaporação da água acumulada na junção do termopar.

Esta evaporação esfria a junção do termopar dentro da câmara, que fica com temperatura inferior ao termopar situado fora da câmara. Isso provoca a passagem de uma pequena corrente elétrica entre ambos, a qual é proporcional a esse decréscimo de temperatura. Esse decréscimo de temperatura é medido por um microvoltímetro, indicando a U.R. e o ψ do ar na câmara e, portanto, o ψ da amostra.

A conversão da voltagem em unidades de pressão (que medem o ψ) é possível pela calibração de cada câmara psicrométrica com uma série de soluções salinas, de diferentes concentrações e, portanto, diferentes valores de ψ . Cerca de 400 μL de cada solução são aplicados em discos de papel-filtro, determinando-se seu potencial osmótico (ou ψ). Posto que o ψ de cada uma dessas soluções é conhecido com precisão, pode-se construir uma curva (ou fazer regressão), tendo o ψ como função de microvolts e determinar um fator de correção para cada câmara psicrométrica, a ser multiplicado pelo valor lido.

O potencial hídrico é definido como: $\psi = \psi_p - \psi_\pi$, em que ψ_p é o turgor e ψ_π o potencial osmótico. Empregando-se N_2 para quebrar as membranas celulares e remover o turgor da amostra, obtém-se o valor de ψ_π . Subtraindo-se ψ de ψ_π , tem-se ψ_p e o conhecimento, assim, de todo o

balanço hídrico do tecido (ex. Matsuda & Riazi 1981, Cavaliere & Boyer 1982, Westgate & Boyer 1984, Passos 1989). Em razão dessa versatilidade, a psicrometria de termopar é o método mais empregado para medir o balanço hídrico de plantas (Boyer, 1987).

Existem modelos comerciais de psicrômetros de termopar. Todavia, a construção dessas unidades no laboratório é factível (figura 9), conforme o procedimento de Spomer (1974).

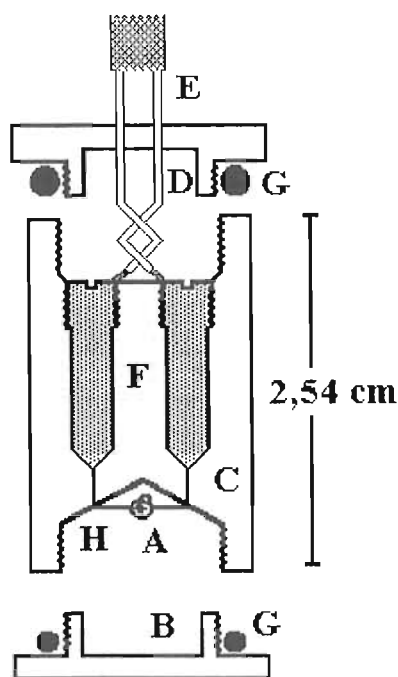


FIGURA 9. Câmara psicrométrica de termopar, consistindo de (A) junção trocável de *chromel-constantan* (0,0025 cm de diâmetro); (B) câmara rosqueável de *teflon* para a amostra; (C) corpo da câmara, de *teflon*; (D) tampa rosqueável de *teflon*; (E) fios de cobre cobertos com plástico; (F) dissipador de calor e fios conectores; (G) anéis de borracha para selagem, cobertos com vaselina; e (H) conectores de *teflon* para selar os orifícios dos fios do termopar (adaptado de Spomer, 1974).

23.2. Vantagens e Limitações do Método

Além de permitir medição direta dos potenciais hídrico e osmótico, e indireta do turgor, o método apresenta as seguintes vantagens: (a) a medição baseia-se em referência física, e não biológica. Isso permite a comparação rigorosa entre experimentos; e (b) a caracterização do balanço hídrico em termos de potencial químico é uma indicação direta da energia que move a água de um lugar para outro no sistema solo-planta.

O método apresenta as seguintes limitações: (a) a interação entre o termopar e a amostra segue um gradiente de difusão, que envolve vapor e transferência de calor. Exceto no ponto isopiéstico (sem gradientes de pressão), em que a taxa líquida dessas transferências é zero, todos os fatores que afetarem a transferência de vapor e de calor irão afetar também as medições. Boyer & Knipling (1965) desenvolveram um psicrômetro isopiéstico, mas sua construção é muito difícil; (b) a

excisão do tecido para medição cria uma superfície cortada e interrompe o suprimento de água; (c) o tecido continua crescendo após a excisão, gerando relaxamento da parede celular (por falta de entrada de água) e subestimativa de ψ_p (Cosgrove et al., 1984); e (d) a quebra das membranas pelo N_2 líquido destrói a compartimentalização da célula, gerando diluição apoplástica para o ψ_π medido (Boyer, 1987).

23.3. Procedimento Típico

- A. Remova, cuidadosamente, as folhas a serem amostradas e as alinhe sobre uma placa de vidro.
- B. Corte, com lâmina ou furador, uma amostra da região do limbo foliar a ser medida. Coloque, usando uma pinça, 1-4 seções foliares por câmara psicrométrica. Anote cada tratamento e o respectivo número da câmara psicrométrica em uma planilha, na qual os resultados serão registrados.
- C. Feche a tampa da câmara e deixe o psicrômetro pendurado, pelo fio, em um suporte horizontal, com a tampa virada para baixo. Somente inicie colocação de amostra em outro psicrômetro após haver completado toda a operação com a amostra anterior.
- D. Coloque os psicrômetros, com a tampa virada para baixo, em banho-maria circulante, a 26°C. Deixe repousar por 3 h, para que a temperatura dentro da câmara se equilibre com a exterior.
- E. Faça cada medição conectando o psicrômetro ao microvoltímetro e seguindo as instruções do fabricante. Tipicamente, as leituras são feitas na amplitude de 10 μV , após aplicação de resfriamento, por 15-20 s.
- F. Remova as câmaras do banho-maria, após haver feito a leitura de todas as amostras. Mergulhe cada câmara psicrométrica, por 5 s, em N_2 líquido e deixe equilibrar por 10-15 min, na temperatura ambiente.
- G. Coloque as câmaras novamente no banho-maria e deixe repousar por 2 h. Faça nova leitura no microvoltímetro, a qual corresponderá ao π , visto que o congelamento quebra todas as membranas, portanto removendo o turgor.
- H. Multiplique a leitura feita (em μV) pelo fator de correção, para cada psicrômetro, obtendo os valores de ψ e ψ_π , diretamente em bars. Visto que 10 bars = 1 MPa, expresse seus resultados em MPa. Com base na expressão $\psi = \psi_p - \psi_\pi$, calcule o turgor de cada amostra.

23.4. Variações da Técnica

- Para medir o ψ de folhas intactas, Boyer (1968) desenvolveu uma câmara psicrométrica com tamanho suficiente para conter uma lâmina foliar inteira, a qual fica isolada do ambiente exterior por selagem com vaselina. Para a medição, um termopar, contendo água na junção, é inserido na câmara onde está a folha. Após 45-90 min, a leitura se estabiliza e o termopar é retirado, sendo substituído por outro, contendo uma solução osmótica com ψ próximo ao da folha. As leituras dos dois termopares são lançadas em gráfico, como função do ψ da segunda solução, fazendo-se a extrapolação para saída = zero. A concepção dessa classe de psicrômetros, chamados de *in situ*, foi posteriormente alterada (Savage et al., 1983) para se fazer a medição com apenas um termopar e amostrando apenas parte da folha intacta.
- Outra variação é a introdução de termopar possuindo solução de sacarose de ψ conhecido dentro da câmara psicrométrica, fazendo-se medições isopiásticas (Boyer et al., 1985), ou seja, a pressão de vapor da solução é a mesma que a do tecido, sem ocorrência de troca líquida de vapor. A inclusão de uma guilhotina no aparato permite monitorar os efeitos da excisão sobre o ψ . Como alternativa, ψ_π pode ser medido em amostras da seiva expressa de tecidos frescos ou descongelados, com um osmômetro de pressão de vapor (Cosgrove et al., 1984).

23.5. Referências Bibliográficas

- BOYER, J.S.; CAVALIERI, A.J.; SCHULZE, E.D. Control of the rate of cell enlargement: excision, wall relaxation, and growth-induced water potentials. **Planta**, Berlin, v.163, p.527-543, 1985.
- BOYER, J.S.; KNIPLING, E.B. Isopiestic technique for measuring leaf water potentials with a thermocouple psychrometer. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, Washington, v.54, p.1044-1051, 1965.
- BOYER, J.S. Relationship of water potential to growth of leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.43, p.1056-1062, 1968.
- BOYER, J.S. Thermocouple psychrometry in plant research. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, 3., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.26-30.
- CAVALIERI, A.J.; BOYER, J.S. Water potentials induced by growth in soybean hypocotyls. **Plant Physiology**, Rockville, v.69, p.492-496, 1982.
- COSGROVE, D.J.; VAN VOLKENBURGH, E.; CLELAND, R.E. Stress relaxation of cell walls and the yield threshold for growth. Demonstration and measurement by micro-pressure probe and psychrometer techniques. **Planta**, Berlin, v.162, p.46-54, 1984.
- MATSUDA, K.; RIAZI, A. Stress induced osmotic adjustment in growing regions of barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.68, p.571-576, 1981.
- NEUMANN, H.H.; THURTELL, G.W. A Peltier cooled thermocouple dewpoint hygrometer for *in situ* measurement of water potentials. In: BROWN, R.W.; VAN HAVEREN, B.P. eds. **Psychrometry in water relations research**. Logan: Utah State University, 1972. p.103-112.
- PASSOS, L.P. **Growth and water status responses of mung bean (*Vigna mungo* L.) and other dicot species to osmotic stress**. Tucson: University of Arizona, 1989. 108 p. Dissertação de Doutorado.
- SAVAGE, M.J.; WIEBE, H.H.; CASS, A. *In situ* field measurement of leaf water potential using thermocouple psychrometers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, p.609-613, 1983.
- SPOMER, L.A. Construction of welded 'wet loop' thermocouple psychrometer junctions. **Agronomy Journal**, Madison, v.66, p.456-457, 1974.
- WESTGATE, M.E.; BOYER, J.S. Transpiration- and growth-induced water potentials in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.74, p.882-889, 1984.

24. RELAÇÕES HÍDRICAS II - BOMBA DE PRESSÃO

CUIDADOS

- Não desconecte a mangueira quando esta estiver sob pressão - sempre verifique, antes, se o manômetro no tanque de nitrogênio está zerado. A presilha na mangueira, próxima ao tanque, poderá ser afrouxada, para aliviar a pressão.
- **Sempre teste a válvula de segurança antes de operar o instrumento.**
- Não use a válvula de controle de vazão para desligar o instrumento. Isso poderá danificar a base da mesma, impossibilitando futuras mudanças graduais no nível de pressão.
- Mantenha-se afastado da abertura da câmara, onde está a amostra. Pecíolos podem ser expelidos, com violência, devido à pressão.

24.1. Introdução

O uso moderno da bomba de pressão para avaliar as relações hídricas em tecidos vegetais foi estabelecido por Scholander et al. (1965). O método requer a aplicação de pressão pneumática ao tecido, para aumentar artificialmente seu ψ . A pressão necessária para elevar o ψ do tecido para zero é aceita como o negativo do ψ do tecido antes da pressurização. Se for assumido que os gradientes de ψ em um dado órgão são desprezíveis, então pode-se também assumir que ψ do xilema = ψ da parede celular = ψ dentro do tecido. Para a medição do ψ com base na pressão de balanceamento (ou seja, aquela necessária para forçar a água do tecido para fora da superfície cortada do pecíolo), o órgão é destacado da planta e colocado na bomba de pressão, com a extremidade onde está o xilema (corte no pecíolo) estendendo-se para fora da câmara, envolta pelo sistema de vedação. A pressão é aplicada até que a seiva apareça na superfície do corte. O negativo da pressão necessária para produzir a exsudação (quando a pressão do xilema se iguala à pressão atmosférica) é considerado igual ao ψ do tecido, no momento do corte. Nesse método, como apenas uma aplicação de pressão é feita, usa-se N_2 ou ar como instrumento de pressão.

Além de medir o ψ , é possível empregar a bomba de pressão para estimar o ψ_{π} do tecido, com base no fato do turgor ser zero, quando $\psi = \psi_{\pi}$. Um método para extrapolar medições feitas nessa condição, de maneira a obter cada ψ_{π} correspondente a valores positivos de ψ_P , foi proposto por Tyree & Hammel (1972) e tem sido usado em inúmeros estudos desde então. A técnica tem o seguinte fundamento: se medições de ψ são feitas em uma amplitude de teores hídricos e então lançadas em gráfico, tendo o inverso do potencial hídrico ($1/\psi$) como função do teor relativo de água (TRA), a extrapolação da linha reta desenhada, para $P < 0$, fornecerá uma estimativa do ψ_{π} em valores de TRA localizados acima de $P = 0$.

Na prática, a exsudação é coletada, na medida em que a amostra é submetida a aumentos graduais de pressão, causando aumentos correspondentes no ψ do tecido. A curva assim obtida é chamada de *curva pressão-volume*, ou P-V. Nessa abordagem, visto que a mesma amostra é submetida a várias pressões, uma mistura de N_2 e O_2 é usada como vetor de pressão, para evitar oxidação da membrana celular.

Neste capítulo são descritas as operações para medição da tensão do xilema e determinação da curva P-V (Jachetta et al., 1986), usando diferentes aparatos. Adicionalmente, um método é descrito para se usar as exsudações obtidas no preparo da curva P-V também na determinação das

concentrações de solutos presentes no apoplasto da folha. O exemplo refere-se a amostras de girassol (*Helianthus annuus* L.).

Para simplificar o texto, o pecíolo e respectivo corte são referidos como a parte a ser posicionada do lado de fora da câmara da bomba de pressão. Evidentemente, estas técnicas são aplicáveis a outros órgãos além da folha, tais como raízes e ramos, tendo-se o critério de colocar o tecido com o xilema para o lado externo da câmara. Para outras considerações, o leitor deve consultar Joly & Zaerr (1987) e Turner (1987).

24.2 Medição da Tensão no Xilema

24.2.1. Ajustes Preliminares na Bomba de Pressão

- A. Desprenda a tampa. O anel de selagem, em posição desde o dia anterior, poderá estar muito preso, inicialmente. Mova a tampa para frente e para trás várias vezes e então remova o anel. Verifique se o anel está limpo e bem lubrificado. Normalmente, vaselina é usada como lubrificante.
- B. Insira uma rolha de borracha adequada na tampa e instale-a na câmara.
- C. Conecte as extremidades da mangueira à bomba e ao tanque de nitrogênio (pressão máxima de 2.200 psi).
- D. Mova a válvula de controle no instrumento para a posição de desligamento.
- E. Abra a válvula do tanque de nitrogênio. Meia volta ou uma volta geralmente será suficiente.
- F. Examine a válvula de pressão. Instale e gire a tampa no sentido horário até o fim da rosca. Ato contínuo, gire-a em 15°, no sentido anti-horário, de maneira que a roda com saliência pressione o êmbolo da válvula de segurança para baixo.
- G. Gire a válvula de operação para a posição de pressurização da câmara. A válvula de segurança se abrirá antes que a pressão na câmara atinja 200 psi. A pressão na câmara cairá para próximo a zero.
- H. Gire a válvula de controle para a posição de exaustão, pressione o êmbolo da válvula de segurança e teste novamente. Se a válvula de segurança não funcionar a 25 psi ou menos, remova o parafuso de retenção e verifique se o êmbolo apresenta problemas. Mantenha o anel de vedação do êmbolo sempre bem lubrificado.
- I. Ajuste a válvula de vazão. Gire a tampa no sentido horário, até o fim. Ao mesmo tempo, o êmbolo da válvula de segurança da tampa será empurrado para baixo pela roda com saliência.
- J. Gire a válvula de controle para pressurizar a câmara.
- K. Ajuste a válvula de controle de vazão até que a pressão na câmara aumente até a taxa desejada. A taxa poderá ser mudada a qualquer momento, mesmo durante as medições.
- L. Use taxas baixas (ex. 5 psi.s⁻¹) para plantas sob baixo estresse hídrico.
- M. Gire a válvula de controle para a posição de exaustão e remova a rolha de borracha da tampa.

24.2.2. Procedimento Específico

- A. Destaque uma folha, juntamente com o pecíolo, usando lâmina afiada. Quanto mais lisa a superfície do corte, melhor.
- B. Insira, imediatamente, o pecíolo em uma rolha de borracha com orifício central e pressione a rolha na abertura da tampa da câmara, com a ponta do pecíolo ficando de fora, em comprimento suficiente para visualização de exsudações. Observe que:
 - a) A inserção de tecidos frágeis ou suculentos pode ser conseguida com o uso de uma ferramenta apropriada (disponível comercialmente).
 - b) Selecione uma rolha com furo em diâmetro apropriado para permitir um encaixe de fricção.

- C. Coloque a tampa na câmara e gire-a no sentido horário até o fim da rosca.
- D. Gire a válvula de controle para a posição "câmara". Observe a superfície do corte no pecíolo. Use lupa manual para órgãos pequenos. Ajuste a válvula de vazão, conforme necessário.
- E. Gire a válvula de controle para a posição de desligamento, quando um filme de água aparecer na superfície do corte. A exsudação é, geralmente, acompanhada por uma mudança na cor do corte, de esbranquiçado para escuro (marrom) e aparência espelhada. **Pequenos vazamentos de gás em volta do pecíolo não são objeto de alarme.**
- F. Anote a pressão do manômetro. Ela equivale, em sinal trocado, à tensão existente no xilema.
- G. Gire a válvula de controle para a posição de exaustão. Remova a tampa da câmara e descarte a amostra. O instrumento está pronto para outra medição.

24.2.3. Procedimento Após as Medições

- A. Feche a válvula do tanque de nitrogênio.
- B. Faça a exaustão da pressão remanescente na mangueira, girando a válvula de controle para a posição "câmara", na medida em que a tampa é removida. Abra a válvula de vazão para apressar o processo.
- C. Certifique-se de que a mangueira não está pressurizada (verifique o indicador do manômetro no tanque de nitrogênio). Desconecte a rosca que prende a mangueira ao tanque e, em seguida, o conector da mangueira à bomba de pressão.

24.2.4. Troca da Peça de Inserção da Tampa

- A peça de inserção da tampa pode ser trocada, para se obter encaixe de pecíolos ou hastes de diâmetro variado. Para isso:
 - A. Remova os quatro parafusos de retenção na tampa da câmara.
 - B. Certifique-se de que os quatro anéis de borracha para vedação estão no lugar certo, no corpo da tampa. Caso contrário, haverá vazamento.
 - C. Instale a inserção de tamanho desejado.
 - D. Encaixe os quatro parafusos de retenção por meio da nova peça de inserção e aperte bem, mas sem excessos.

24.3. Curva P-V e Medição dos Solutos no Apoplasto

24.3.1. Instalação da Amostra

- A. Colete as amostras antes do amanhecer, em plantas mantidas em atmosfera saturada durante a noite anterior.
- B. Coloque a folha cortada imediatamente em saco plástico com, aproximadamente, 2 mL de água (Wenkert et al., 1978), para reduzir flutuações na temperatura e perda de água pelo tecido durante as alterações de pressão. Para melhorar as condições de umidade, sobre repetidas vezes no saco plástico, até que haja condensação de umidade nas paredes dele.
- C. Coloque a amostra dentro do saco plástico. Antes disso, espere cerca de 2 min para que haja equilíbrio com a atmosfera exterior.
- D. Acondicione a folha dentro da embalagem, expulsando todo o ar, de maneira que a abertura possa, depois, ser selada pela parte inferior do anel de látex da tampa da câmara da bomba de pressão.

- E. Coloque a amostra assim preparada em um segundo saco plástico, seco, e proceda como no passo D.
- F. Coloque a amostra na câmara, certificando-se de que nenhum dos dois sacos plásticos esteja penetrando no orifício de entrada.
- G. Padronize o comprimento do pecíolo em todas as medições (ex. 5 cm, para o girassol).
- H. Coloque 1 mL de água no ponto em que o pecíolo sai da tampa da câmara e aumente a pressão para 0,02 MPa. O anel de látex será apertado até o ponto em que bolhas de gás não mais escapem, em volta da base do pecíolo.
- I. Remova a água colocada em volta do pecíolo (no topo da câmara) com papel absorvente. Dessa forma, o pecíolo estará selado no encaixe, sem receber compressão mecânica considerável.
- J. Empregue uma mistura gasosa de 98% de N₂ e 2% de O₂ para pressurizar a câmara.

24.3.2. Gradiente de Pressão

- A. Determine o valor da pressão de balanceamento inicial. Para isso, aplique pressão até que a seiva apareça na superfície do corte no pecíolo. Reduza então a pressão, até que o menisco da seiva recue ligeiramente para dentro do corte.
- B. Aplique novos aumentos graduais de pressão, a intervalos de 0,1-0,2 MPa, espere 15 min após cada um deles e, então, colete a exsudação.
- C. Estabeleça a nova pressão de balanceamento, primeiro reduzindo a pressão, gradualmente, até que o menisco recue ligeiramente para dentro da superfície do corte e, depois, aumentando a pressão a pequenos intervalos, até alcançar nova pressão de balanceamento.
- D. Colete a seiva exsudada usando um tubo de vidro com papel absorvente. Selecione um tubo que tenha diâmetro levemente maior que o diâmetro do pecíolo. Pese o tubo coletor imediatamente antes e após a coleta da seiva.
- E. Calcule o TRA, a partir da equação:

$$\text{TRA} = \frac{W_0 - W_d - V_e}{W_0 - W_d} \cdot 100$$

em que: W_0 = peso fresco da folha totalmente hidratada ($\psi = 0$)
 W_d = peso seco da folha após secagem a 60°C por 24 h
 V_e = peso da seiva exsudada nas diversas pressões de balanceamento

- F. Faça a curva P-V, colocando $1/\psi$ como função do TRA. Calcule a regressão linear.
- G. A partir da reta obtida, determine o provável teor de água apoplástica da folha no ponto em que a curva intercepta $1/\psi = 0$ na abcissa. Vide exemplo na figura 10.

24.3.3. Distribuição dos Solutos Apoplásticos

- A concentração do soluto é estudada pela seguinte análise da exsudação do xilema, obtida após pequenos aumentos de pressão, à medida em que a amostra se desidrata:
 - A. Destaque a folha e a coloque na bomba de pressão, como na determinação de P-V.
 - B. Lave o corte no pecíolo com água destilada, por 30 s, e seque-o com papel absorvente, antes de colocar a folha na câmara.
 - C. Determine a pressão inicial de balanceamento e aumente a pressão, em intervalos de 0,02 a 0,04 MPa.

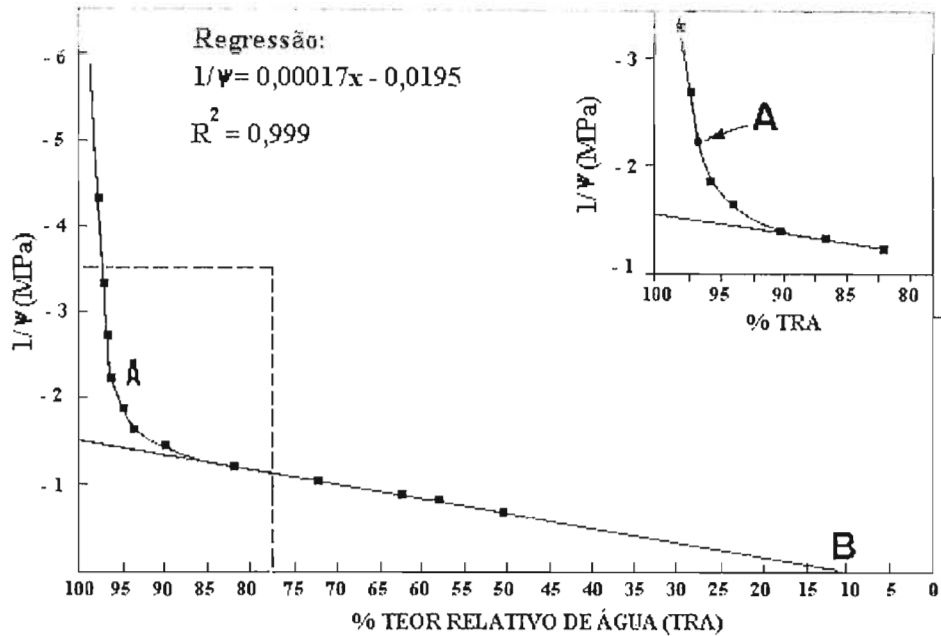


FIGURA 10. Curva P-V de uma folha de girassol expandida. O ponto A estima $\psi_p = 0$, o ponto B estima o volume de água apoplástica, em percentagem. A equação de regressão refere-se à segunda porção linear da curva (adaptado de Jachetta et al., 1986).

- D. Colete a exsudação, após 3-5 min da aplicação da nova pressão, e despressurize a câmara em apenas 0,01-0,02 MPa abaixo da nova pressão de balanceamento (maiores decréscimos causarão mistura dos solutos apoplásticos e impedirão a determinação do gradiente de distribuição dos mesmos).
- E. Colete cada exsudação em disco de papel-filtro ($0,32 \text{ cm}^2$), previamente colocado sobre o corte do pecíolo. Quando saturado, o disco deverá conter cerca de $8 \mu\text{L}$ de exsudação.
- F. Coloque uma minicubeta, em posição invertida, envolvendo o corte no pecíolo. Observe que a base da minicubeta deve conter papel absorvente saturado com água, para formar uma câmara úmida e retardar a evaporação da seiva no papel-filtro (figura 11).
- G. Colete o disco com uma pinça, quando aquele estiver saturado, e transfira-o, imediatamente, para a câmara de amostra de um osmômetro de vapor e determine o ψ_π . Faça cinco repetições.
- H. Prepare um gráfico, tendo a exsudação (mOs.kg^{-1}) como função da pressão aplicada.

OBSERVAÇÃO

- Conforme proposto por Jachetta et al. (1986), pode-se esperar as seguintes origens, por fração de exsudação: (1ª) pecíolo e nervura central, (2ª) vasos secundários e parede celular, e (3ª) sob altas pressões, seiva de células vivas, com concentração de solutos muito baixa.

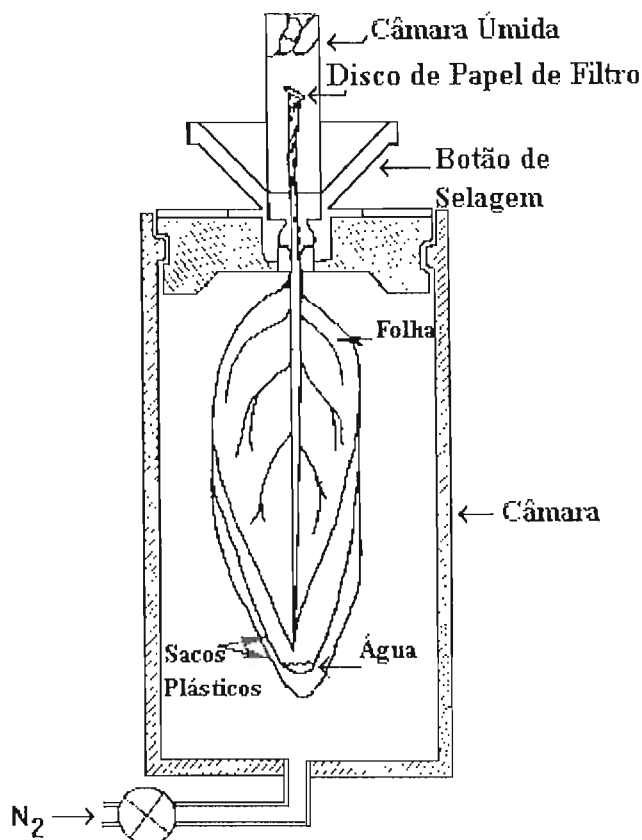


FIGURA 11. Diagrama da bomba de pressão empregada para a obtenção da curva P-V (adaptado de Jachetta et al., 1986).

24.4. Limitações do Uso da Bomba de Pressão

- Assume-se que a pressão aplicada é igual ao ψ do xilema e que este é o ψ da folha inteira. Caso existam gradientes de ψ na folha (gerados pela corrente transpiratória), esse pressuposto poderá não ser válido.
- As relações de ψ com o crescimento não podem ser estabelecidas, porque é impossível amostrar-se a região de crescimento da folha.
- O volume apoplástico, obtido pela curva P-V, às vezes, é muito elevado, não condizendo com cálculos baseados em observações anatômicas.
- O gradiente de pressão destrói a pressão de balanceamento inicial e os *balanços* subsequentes não refletem um equilíbrio real.

24.5. Guia para a Solução de Problemas Frequentes

Problema	Causa	Solução
A. Plantas apresentando alta transpiração no momento da amostragem.	Se o módulo de elasticidade for elevado, uma pequena perda de água causará grande queda em ψ . Turner & Lang (1980) detectaram, 20 s após o corte, reduções de até 0,7 MPa.	- Acondicione a folha em saco plástico (Wenkert et al., 1978). - Mantenha a planta sob saturação de umidade, antes de fazer o corte.
B. Erro de exclusão, ou seja, parte da água expelida pela pressão ocupa os espaços intercelulares do tecido situado do lado de fora da câmara.	Algumas bombas de pressão, com lóbulos internos, requerem longas seções de pecíolo na parte externa, para que a superfície do corte possa ser visualizada.	- Restrinja o comprimento do tecido que fica para fora da câmara ao mínimo necessário (Millar & Hansen, 1975).
C. Condensação de água na superfície da amostra dentro da câmara.	Transpiração está elevada.	- Idem ao item A. - Adicione cerca de 1 mL de água ao saco plástico da amostra.
D. Excesso de exsudação no corte, produzindo elevado valor de ψ .	O tecido fora da câmara está muito longo.	- Idem ao item B.
E. Exsudação após um segundo corte no pecíolo.	A tensão original, que seria contrabalançada pela pressão da bomba, foi reduzida ou removida.	- JAMAIS faça um segundo corte na amostra, estando esta já na câmara ou não (Scholander et al., 1965).
F. Valor do ψ está muito alto ou muito baixo, em comparação com valores obtidos por outros métodos.	A pressurização da câmara foi muito rápida e os valores foram afetados pela existência de gradientes de ψ dentro do tecido (Turner, 1986).	- Faça a pressurização devagar. Algumas espécies requerem períodos de equilíbrio muito longos (Tyree & Dainty, 1973), tornando a medição impraticável. Nesses casos, uma margem de erro terá de ser aceita.
G. Exsudação falsa: a seiva expelida ainda não é o volume expulso pela pressão.	Em algumas espécies, o gás passa direto pelos espaços intercelulares e escapa pelo corte.	- Seque o corte com papel absorvente. - Faça uma constrição no pecíolo (McCown & Wall, 1979).

24.6. Referências Bibliográficas

JACHETTA, J.J.; APPLEBY, A.P.; BOERSMA, L. Use of the pressure vessel to measure concentrations of solutes in apoplastic and membrane-filtered symplastic sap in sunflower leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.995-999, 1986.

JOLY, R.J.; ZAERR, J.B. Alteration of cell-wall water content and elasticity in Douglas-fir during periods of water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p.418-422, 1987.

- MILLAR, B.D.; HANSEN, G.K. Exclusion errors in pressure chamber estimates of leaf water potentials. **Annals of Botany**, London, v.39, p.915-920, 1975.
- McCOWN, R.L.; WALL, B.H. Improvement of pressure chamber measurements of two legumes by constriction of stems. **Plant & Soil**, Dordrecht, v.52, p.447-451, 1979.
- SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, Washington, v.148, p.339-346, 1965.
- TURNER, N.C. Crop water deficits: a decade of progress. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.39, p.1-51, 1986.
- TURNER, N.C.; LONG, M.J. Errors arising from rapid water loss in the measurement of leaf water potential by the pressure chamber technique. **Australian Journal of Plant Physiology**, East Melbourne, v.7, p.527-537, 1980.
- TURNER, N.C. The use of the pressure chamber in studies of plant water status. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS. 2., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.13-24.
- TYREE, M.T.; DAINTY, J. The water relations of hemlock (*Tsuga canadensis*). II. The kinetics of water exchange between symplast and apoplast. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.51, p.1481-1489, 1973.
- TYREE, M.T.; HAMMEL, H.T. The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. **Journal of Experimental Botany**, London, v.23, p.267-282, 1972.
- WENKERT, W.; LEMON, E.R.; SINCLAIR, T.R. Changes in water potential during pressure bomb measurement. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, p.353-355, 1978.

25. RELAÇÕES HÍDRICAS III - SONDA DE PRESSÃO

CUIDADOS

- Antes de fazer a primeira penetração na célula, calibre a sonda de pressão com um manômetro. Certifique-se de que a saída do transdutor de pressão (figura 12) se correlaciona linearmente com a pressão aplicada.
- Na calibração, tanto a pressão ascendente quanto a descendente têm de propiciar a mesma relação linear, para mostrar que a sonda não exibe histerese.

25.1. Introdução

Os métodos mais clássicos de medição do balanço hídrico de plantas apresentam fontes de erro (vide capítulos 23 e 24 e tabela 10) que limitam sua precisão. Segundo Boyer (1987), somente a sonda de pressão e a psicrometria isopiástica propiciam medições precisas do turgor. De fato, métodos como a psicrometria de termopar tendem a não detectar diferenças inferiores a 0,1 MPa, que é uma faixa de potencial em que ocorrem vários processos em resposta a variáveis ambientais, conforme numerosos relatos. Em decorrência, a sonda de pressão tem tido crescente emprego, especialmente nos estudos ligados ao relaxamento da parede celular.

A sonda de pressão consiste de um tubo microcapilar de vidro com óleo de silicone, que é introduzido em uma célula da epiderme, sob exame de microscópio ocular. Imediatamente após a penetração, um menisco é formado, na interface do óleo com a solução citoplasmática, ocorrendo equilíbrio, após alguns minutos. A pressão nesse ponto, medida por um transdutor de pressão (Frensch & Hsiao, 1994), equivale ao turgor. Via de regra, o potencial osmótico é medido com osmômetro de pressão de vapor e o valor de ψ é obtido pela soma de ψ_{π} e ψ_p .

O presente procedimento é uma adaptação do método empregado por Cosgrove et al. (1981) em *Pisum sativum* L. para a medição direta do turgor, do limiar de relaxamento (*yield threshold*) da parede celular e da taxa de crescimento, em segmentos seccionados do epicótilo de plantas cultivadas no escuro.

25.2. Considerações sobre o Relaxamento da Parede Celular

O crescimento de células depende da ocorrência simultânea de absorção de água e expansão da parede celular. Numerosas evidências sugerem que o processo se inicia com o relaxamento da parede celular, causado por extrusão de prótons (a qual é, provavelmente, induzida por auxinas). Ocorre, então, um subsequente aumento de volume, movido pelo turgor da célula, o qual decresce imediatamente para um limiar de relaxamento (Cleland, 1959). Nesse ponto, ocorre nova absorção de água, restaurando o turgor. Sob crescimento intenso, ψ_p ficará constante, porque o relaxamento da parede é balanceado pela expansão no volume. Maiores detalhamentos sobre o assunto são apresentados por Cosgrove & Knievel (1987).

De acordo com Lockhart (1965) e Molz & Boyer (1978), a taxa da extensão celular é função, teoricamente, da grandeza na qual o valor de ψ_p excede o limiar de relaxamento, em obediência à expressão:

$$G = m (\psi_p - Y)$$

em que: G é a taxa de crescimento ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), m é a extensibilidade da parede celular ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$), ψ_p é o potencial de turgor e Y o limiar de relaxamento. Visto que esse conceito foi baseado em células individuais, mas vem sendo aplicado em tecidos multicelulares, Calbo & Pessoa (1994) derivaram a equação proposta por Lockhart, estendendo sua aplicação a sistemas multicelulares submetidos à sucção.

Vários problemas, contudo, têm sido encontrados na determinação dos componentes da equação de crescimento. Valores de Y têm sido obtidos por imersão de segmentos de tecidos em soluções osmóticas (ex. Cleland, 1967a) ou suprimindo o fornecimento de água para determinar o turgor no qual o crescimento é paralisado (ex. Boyer, 1968). Matyssek et al. (1988) verificaram que os valores de Y podem ser alterados nas várias horas de incubação requeridas pelas determinações.

Os valores de m têm sido estimados como o ângulo da curva de crescimento, em um período de horas, de segmentos destacados em soluções osmóticas, em função de seu turgor (ex. Cleland, 1968). A extensibilidade tem sido também estimada em tecidos mortos. Na técnica do *Instron* (Cleland, 1967b, Rayle & Cleland 1972, Cleland et al. 1987 e Neumann et al. 1988), uma tensão constante é aplicada a paredes celulares de tecidos mortos e um valor de extensibilidade plástica (DP) é estimado a partir da taxa na qual o tecido se expande. Assume-se que a DP é proporcional a m . Outro método com tecidos mortos é o do estresse de relaxamento (Yamamoto et al., 1970), no qual as paredes celulares são rapidamente estendidas a um nível predeterminado e mantidas assim até que a tensão decresça. Assume-se que o tempo necessário para esse decréscimo é diretamente proporcional ao valor de m . Todavia, o estresse viscoelástico de relaxamento em tecidos vivos envolve trocas metabólicas e não é unidirecional, como nas técnicas de Cleland e Yamamoto.

Visando solucionar essa limitação, Cosgrove et al. (1984) empregaram a sonda de pressão para medir diretamente o limiar de relaxamento. Para isso, eles assumiram que, se o suprimento de água for gradualmente restringido com soluções osmóticas, o relaxamento conduzido bioquimicamente irá continuar até que Y seja atingido. Os valores de m foram obtidos a partir dos meios-tempos para detecção de relaxamento, medido pela sonda de pressão proposta por Husken et al. (1978).

25.3. Procedimento

- A. Construa o aparato para monitorização das mudanças em comprimento de segmentos individuais e concomitante medição do turgor (figura 12).
- B. Selecione plântulas de 6-7 dias, cultivadas no escuro a 28°C. Faça as manipulações sob luz verde difusa, de diodo de gálio-fosfito (pico de emissão: 565 nm, largura de banda: 30 nm).
- C. Corte segmentos de 1,5 cm de comprimento da região do epicótilo (segundo entrenó), imediatamente abaixo do gancho apical. Selecione plântulas com 8-12 cm de altura e 1,3-2,0 mm de diâmetro.
- D. Prenda a parte basal do segmento do epicótilo em uma câmara vertical de vidro, por meio de dois parafusos de náilon. Na outra ponta do segmento, 1 cm acima dos parafusos, conecte um transdutor de posição, para transferir o sinal de crescimento do segmento seccionado. Faça a conexão do transdutor a uma impressora gráfica, via condicionador de sinal e diferenciador de média.
- E. Mantenha o segmento banhado em fluxo contínuo de solução KCl 1mM ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$).
- F. Certifique-se de que o volume da câmara é de 1,2 mL. Coloque uma válvula no porto de entrada, para efetuar trocas rápidas de soluções como, por exemplo, sacarose (50 mOs), para determinação do meio-tempo médio de ocorrência de mudanças no comprimento do segmento

(expansão ou encolhimento). Essa determinação poderá ser feita sob iluminação normal (vide Cosgrove et al., 1984).

- G. Introduza a sonda de pressão, por meio de orifício lateral na câmara, para determinação do turgor. Sele o orifício com vaselina para impedir vazamento da solução circulante, porém sem afetar a movimentação da sonda.
- H. Adapte uma placa de vidro em uma lateral da câmara para permitir visualização das operações com o tubo microcapilar, através de microscópio horizontal (160 X).
- I. Insira a ponta do tubo microcapilar da sonda (usando micromanipulador) no segmento seccionado e verifique quando o óleo contido no tubo microcapilar é empurrado para dentro da sonda, pela solução citoplasmática. Embora a ponta do tubo microcapilar não possa ser visualizada no microscópio, a entrada da solução citoplasmática será instantânea, indicando que uma célula foi penetrada. Um menisco será formado, a uma pequena distância da superfície do segmento de caule, na interface entre o óleo e a solução citoplasmática, podendo ser monitorado diretamente através do microscópio.

OBSERVAÇÃO

- Penetrações em células internas poderão ser feitas, sem alterar substancialmente o volume existente dentro do tubo microcapilar, porém causando pressão suficiente para empurrar o menisco (formado na primeira penetração) para dentro da sonda.
- Normalmente, a posição do menisco é manipulada com o auxílio de um pequeno motor que move o pistão de metal no reservatório de óleo de silicone da sonda (ex. Hüsken et al. 1978 e Nonami & Boyer 1987). Todavia, por causa das rápidas trocas aquosas que ocorrem nas células corticais de epicótilos cultivados no escuro, faça controle manual da posição do menisco, girando o micrômetro (figura 12), em vez de usar retroalimentação eletrônica.

- J. Use o micrômetro para retornar o menisco para a mesma posição que ele ocupava antes de a sonda haver penetrado na célula. Nessa posição, mova o menisco ligeiramente para a frente e para trás, para assegurar que existe contato hidráulico com a solução celular. Caso o contato não exista, além do menisco permanecer imóvel, grandes mudanças de pressão serão detectadas com diminutos movimentos no micrômetro da sonda.
- L. Manipule a sonda sob luz verde difusa (ex. lâmpada de tungstênio guiada em refletor com filtro plástico verde, apresentando transmissão máxima a 525 nm e transmissão desprezível abaixo de 475 nm e acima de 575 nm). Limite cada seção de iluminação a 10 min.

OBSERVAÇÃO

- Visto que a pressão captada pela sonda é registrada numa impressora, o valor de ψ_p pode ser determinado, conforme segue: no momento da inserção, o citoplasma tende a avançar e é contrabalançado pela aplicação de pressão na sonda. Após alguns minutos (com subidas e descidas na pressão detectada), obtém-se o equilíbrio, cuja pressão corresponde ao turgor.
- Igualmente, estudos de relaxamento de pressão poderão ser conduzidos, monitorando-se a descida do menisco, após o equilíbrio. Normalmente, quando este cessa a movimentação, atingiu-se pressão equivalente a Y .

OBSERVAÇÃO

- Geralmente, medições são efetuadas decorridos 60-90 min da montagem da amostra, quando a taxa de crescimento tiver se estabilizado em um segundo patamar. Os valores do ψ_p são, tipicamente, obtidos cerca de 10 min após a inserção do tubo microcapilar da sonda.
- O sistema permite monitorar concomitantemente as alterações no ψ_p e na taxa de crescimento do segmento seccionado. Opcionalmente, determine o ψ_π da seiva expressa de tecidos frescos, ou descongelados, usando osmômetro de pressão de vapor ou de ponto de congelamento.

25.4. Uso da Sonda de Pressão para Amostragem da Solução Citoplasmática

- Shackel (1987) empregou o tubo microcapilar da sonda de pressão como micropipeta para retirar amostra da solução citoplasmática (provavelmente, do vacúolo) de células individuais da epiderme, conforme a seguinte técnica:
 - Aplique pequena tensão (-0,02 MPa), penetre a sonda no tecido, com imediata coleta de fluido.
 - Transfira o fluido, rapidamente, para a cavidade da amostra de um osmômetro de ponto de congelamento em nanolitro. A cavidade deve estar preenchida com óleo de silicone.

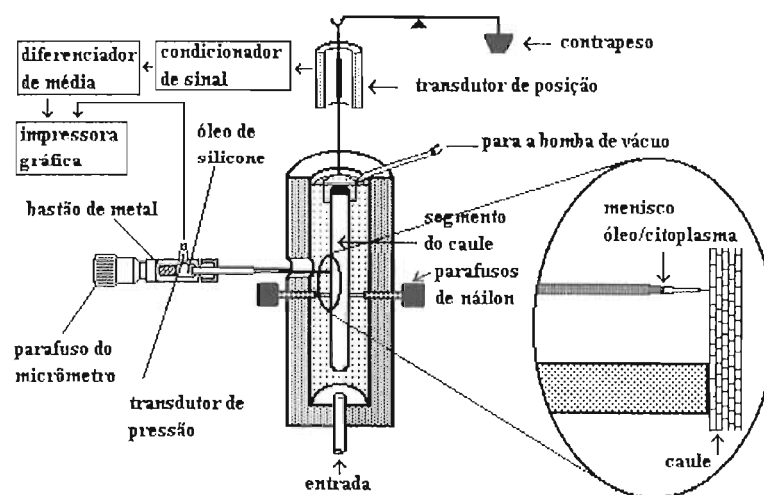


FIGURA 12. Montagem experimental para medição simultânea de parâmetros hídricos e da taxa de alongamento (crescimento) em segmentos do epicótilo de ervilha (adaptado de Cosgrove & Steudle, 1981).

- Faça a transferência da seguinte forma: remova o tubo microcapilar da cubeta de troca gasosa, posicione a ponta do tubo microcapilar abaixo da superfície do óleo no compartimento da amostra e injete uma pequena quantidade do fluido no óleo. Faça a

manipulação manualmente (com o micrômetro ou com sonda de pressão controlada por bastão de vidro). Meça o potencial osmótico da amostra.

25.5. Determinação da Osmolalidade com Osmômetro de Pressão de Vapor

CUIDADOS

- Para a calibração do aparelho, adote somente padrões osmóticos comprovados, ou recém-preparados. Empregue, pelo menos, dois padrões (ex. 290 e 1.000 mmol.kg⁻¹) e uma escala nomográfica. Para outros detalhes, siga as instruções do fabricante.
- Confira a precisão da micropipeta, antes de aplicar amostras.

- Esse aparelho mede a osmolalidade em amostra presente em um disco de papel livre de solutos, o qual é posicionado na câmara da amostra.
- O volume necessário é de apenas 2-10 µL, porque a medição se baseia na pressão de vapor da amostra. Esta é alterada em proporção ao número de partículas de soluto dissolvidas em cada kg do solvente (água). Portanto, ela é uma medida indireta da osmolalidade.
- O sensor é um higrômetro de termopar de fiação delgada, embutido na câmara da amostra.
- Na medição, a pressão do vapor rapidamente se eleva, para atingir o equilíbrio na atmosfera da câmara. A temperatura da câmara, detectada pelo termopar, é o ponto de referência para a medição. Por controle de microprocessador, o termopar procura a temperatura do ponto de orvalho, liberando um sinal proporcional à diferença de temperatura.
- A diferença de temperatura entre o ambiente da câmara e o ponto de orvalho é a depressão de temperatura do ponto de orvalho (DTPO), a qual é função da pressão de vapor da amostra
- A câmara da amostra é mantida a 37°C. A resolução para se medir a DTPO chega a 0,00031°C. Para amostras com osmolalidade de 200 mmol.kg⁻¹ ou mais, o ciclo de medição é, tipicamente, inferior a 1 min.

25.6. Comparação entre os Métodos para Determinação de Parâmetros Hídricos

TABELA 10. Comparação entre os métodos para determinação de parâmetros hídricos em amostras vegetais (adaptado de Shackel, 1987).

Método	Vantagem	Limitação
Psicrômetro de Termopar	A medição é direta	Depende de equilíbrio de vapor
Psicrômetro Isopiéstico	Remove o erro do equilíbrio de vapor	O uso de tecido destacado induz mudanças metabólicas em ψ
Psicrômetro <i>in situ</i>	Não há excisão do tecido	Não é possível estabelecer o equilíbrio térmico
Bomba de Pressão	Medição direta do ψ	Usa órgãos destacados e a obtenção de ψ_{π} pela curva P-V, depende de precisão na determinação do volume apoplástico
Sonda de Pressão	Medição direta do ψ_p	Para se conhecer o valor de ψ , é necessário medir ψ_{π} por outros métodos

25.7. Referências Bibliográficas

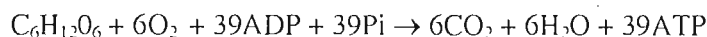
- BOYER, J.S. Relationship of water potential to growth of leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.36, p.473-516, 1968.
- BOYER, J.S. Thermocouple psychrometry in plant research. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, 3., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.26-30.
- CALBO, A.G.; PESSOA, J.D.C. A plant growth re-analysis. An extension of Lockhart's equation to multicellular plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.6, p.83-89, 1994.
- CLELAND, R.E. A dual role of turgor pressure in auxin-induced cell elongation in *Avena* coleoptiles. **Planta**, Berlin, v.77, p.182-191, 1967a.
- CLELAND, R.E.; COSGROVE, D.; TEPFER, M. Long-term acid-induced wall extension in an in-vitro system. **Planta**, Berlin, v.170, p.379-385, 1987.
- CLELAND, R.E. Effect of osmotic concentration on auxin action and on irreversible and reversible expansion of the *Avena* coleoptile. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.12, p.809-825, 1959.
- CLELAND, R.E. Extensibility of isolated cell walls: measurement and changes during cell elongation. **Planta**, Berlin, v. 74, 197-209, 1967b.
- CLELAND, R.E. The role of hormones in wall loosening and plant growth. **Australian Journal of Plant Physiology**, East Melbourne, v.13, p.93-103, 1986.
- COSGROVE, D.J.; KNIEVEL, D.P. **Physiology of cell expansion during plant growth**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1987. 318 p.
- COSGROVE, D.; STEUDLE, E. Water relations of growing pea epicotyl segments. **Planta**, Berlin, v.153, p.343-350, 1981.
- COSGROVE, D.J.; VAN VOLKENBURGH, E.; CLELAND, R.E. Stress relaxation of cell walls and the yield threshold for growth. Demonstration and measurement by micro-pressure probe and psychrometer techniques. **Planta**, Berlin, v.162, p.46-54, 1984.
- FRENSCH, J.; HSIAO, T. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p.247-254, 1994.
- HÜSKEN, D.E.; STEUDLE, E.; ZIMMERMANN, U. Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, p.158-163, 1978.
- LOCKHART, J.A. An analysis of irreversible plant cell elongation. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 8, p.264-275, 1965.

- MATYSSEK, R.; MARUYAMA, S.; BOYER, J.S. Rapid wall relaxation in elongating tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 86, p.1163-1167, 1988.
- MOLZ, F.J.; BOYER, J.S. Growth-induced water potentials in plant cells and tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v.62, p.423-429, 1978.
- NEUMANN, P.M.; VAN VOLKENBURGH, E.; CLELAND, R.E. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, p.233-237, 1988.
- NONAMI, H.; BOYER, J.S. Pressure probe and isopiestic psychrometer measure similar turgor. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p.592-595, 1987.
- RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The in vitro acid-growth response: relation to in vivo growth responses and auxin action. **Planta**, Berlin, v.104, p.282-296, 1972.
- SHACKEL, K.A. Direct measurement of turgor and osmotic potential in individual epidermal cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p.719-722, 1987.
- YAMAMOTO, R.; SHINOZAKI, K.; MASUDA, Y. Stress-relaxation properties of plant cell walls with special reference to auxin action. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.11, p.947-956, 1970.

26. RESPIRAÇÃO - DETERMINAÇÃO EM MITOCÔNDRIOS ISOLADOS

26.1. Introdução

O catabolismo do açúcar, na presença de O₂ em quantidade adequada, efetua a oxidação completa do substrato e acopla esta oxidação à produção de ATP, conforme o esquema abaixo:



As 39 moléculas de ATP produzidas representam um aumento considerável sobre os 4 ATPs por molécula de glicose produzidos no catabolismo anaeróbio (fermentação). As reações que tornam esse incremento possível ocorrem nos mitocôndrios. O produto glicolítico final - piruvato - é descarboxilado e oxidado para produzir CO₂ e NADH₂, o qual é posteriormente reoxidado, liberando energia. Essa reoxidação do NADH₂ é acoplada à formação de ATP a partir do ADP e Pi. Os detalhes dessas reações (ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia respiratória de transporte de elétrons) estão disponíveis em vários livros-textos de bioquímica.

No presente método, propõe-se a medição do consumo de O₂ por mitocôndrios (Miller et al., 1951) de feijão-mungo (*Vigna mungo* L.) tratados com intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. A produção de ATP é demonstrada pelo ensaio da cauda de vaga-lume (*Photinus pyralis*).

26.2. Fundamento

- A técnica baseia-se no fato de o brilho produzido pelos vaga-lumes depender de energia proveniente de ATP. Se uma solução com ATP é adicionada a um preparado de caudas de vaga-lume maceradas, um brilho verde-amarelado será produzido. Isso ocorre porque a luciferase, presente na cauda do vaga-lume, catalisa a oxidação de D-luciferina, na presença de ATP, para gerar oxiluciferina e a luminosidade. O preparado de caudas de vaga-lume é produzido comercialmente.

26.3. Procedimento

26.3.1. Preparo dos Mitocôndrios

- A. Colete a parte aérea de plântulas cultivadas no escuro, com quatro dias de idade. Anote o peso (30-35 g).
- B. Macere a amostra em gral de porcelana a 4°C, com 40 mL de meio homogeneizador (sacarose 0,4 M, Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 0,1 M, pH 7,1).
- C. Filtre o homogeneizado em camada dupla de gaze, com deposição em béquer gelado.
- D. Transfira o filtrado para dois tubos e centrifugue a amostra a 500 x g a 2°C, por 5 min.
- E. Decante o sobrenadante em outro conjunto de tubos e centrifugue a amostra a 10.000 x g a 2°C, por 15 min. Use uma pipeta conectada a um aspirador para remover o sobrenadante.
- F. Ressuspenda o sedimento, com o auxílio de um bastão de vidro a 4°C, em 20 mL do meio homogeneizador. Centrifugue a amostra a 10.000 x g a 2°C, por 15 min.
- G. Remova o sobrenadante, como anteriormente, e ressuspenda o sedimento em 4 mL de meio homogeneizador. **Mantenha o material no gelo.**

26.3.2. Medição do Consumo de O₂

- A. Faça medição manométrica, empregando um respirômetro. Como alternativa, modelos recentes de medidores de FS podem ser usados para medir a evolução de CO₂ (vide capítulo 28).
- B. Prepare um conjunto de oito frascos de reação, conforme o esquema abaixo:

N ^o	Câmara Principal [*]	Braço Lateral
1	2,1 mL MRF ^{**}	0,4 mL de MRF
2	2,1 mL MRF	0,4 mL glicose 140 mM em MRF
3	2,1 mL MRF	0,4 mL de piruvato 150 mM em MRF
4	2,1 mL MRF	0,4 mL de malato 150 mM em MRF
5	2,1 mL MRF	0,4 mL de piruvato 150 mM + malato 150 mM em MRF
6	2,1 mL MRF	0,4 mL de succinato 150 mM em MRF
7	2,1 mL NaF 10 mM em MRF	0,4 mL de succinato 150 mM em MRF
8	2,1 mL NaF 10 mM em MRF	0,4 mL de piruvato 150 mM + malato 150 mM em MRF

^{*} A câmara principal de cada frasco também contém 0,5 mL de mitocôndrios de feijão-mungo.

^{**} MRF (mistura de reação do feijão): tampão fosfato 50 mM (pH 7,1), contendo sacarose 300 mM, MgSO₄ 1 mM e ADP 1 mM.

- C. Conecte os frascos aos manômetros e agite-os a 30°C, por 10 min.
- D. Remova cada frasco cuidadosamente e transfira o conteúdo de cada braço lateral para a câmara principal.
- E. Reconecte os frascos, agite por 1 min e vede o sistema.
- F. Faça leituras a intervalos de 5 min, durante 30 min.
- G. Calcule, empregando a lei dos gases perfeitos ($PV = nRT$), a taxa de consumo de O₂ de cada frasco, expressando os resultados em moles O₂.h⁻¹.g⁻¹. Lembre-se de que g refere-se a peso fresco.

26.4. Demonstração da Produção de ATP

- A. Triture duas caudas de vaga-lume desidratadas em tubo de ensaio, com o auxílio de uma espátula e 0,5 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,1. Prepare um tubo para cada ensaio.
- B. Pipete, após completar as determinações manométricas, 0,5 mL de cada mistura de reação em tubos de ensaio rotulados.
- C. Coloque um tubo com o preparado de cauda de vaga-lume em um suporte para tubos adjacente.
- D. Transfira o material para uma sala escura. À medida que seus olhos se adaptam, será possível visualizar um leve brilho dos preparados de cauda de vaga-lume, por causa do ATP residual.
- E. Injete a mistura de reação em um tubo com preparado de cauda de vaga-lume e verifique se um súbito piscar de cores acontece. Tente comparar os brilhos de cada tubo em termos de intensidade.

26.5. Referência Bibliográfica

MILLERD, A.; BONNER, J.; AXELROD, B.; BANDURSKI, R. Oxidative and phosphorylative activity of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, Washington, v.37, p.855-862, 1951.

27. FOTORRESPIRAÇÃO - ESTIMATIVA

27.1. Introdução

A fotorrespiração é a produção de CO_2 concomitante à FS, conforme observado em plantas C_3 . Atualmente, aceita-se que a oxigenação da RuBP é a fonte do fosfoglicolato que serve de substrato para o metabolismo do glicolato no ciclo fotossintético de oxidação do carbono (o CO_2 liberado na FR é proveniente da oxidação da glicina - duas moléculas de glicina para cada molécula de serina + CO_2). Existem, no entanto, dúvidas quanto às perdas fotossintéticas causadas pela FR e estimativas variam desde 15 a 50%. Tal fato deve-se à existência de fontes potenciais de erros nos métodos mais empregados para estimar a FR havendo, em decorrência, forte tendência dos pesquisadores para o uso de equações, conforme Sharkey (1988).

27.2. Limitações dos Métodos para Estimativa da FR

Os quatro métodos mais empregados para a estimativa da FR têm recebido numerosas críticas, a saber:

- **Aumento Súbito Pós-Iluminatório de CO_2** : ao se apagar a iluminação, o metabolismo da glicina continua após a paralização da assimilação de CO_2 (1 a 4 min), indicando a ocorrência da FR. Todavia, o CO_2 produzido, conforme detecção normalmente feita por analisadores de sinal, pode não ser uma estimativa confiável da FR, porque, muitos argumentam, níveis não desprezíveis de assimilação de CO_2 ainda acontecem após o escurecimento. Além disso, a respiração, pelos mitocôndrios, adiciona CO_2 ao sistema.
- **Liberação de CO_2 em Atmosfera Livre de CO_2** : essa taxa é mascarada por três fontes de erro, a saber: (1) a FR é mais intensa na ausência de CO_2 ; (2) o nível de RuBP tende a ser mais baixo nessas condições; e (3) a Rubisco tem sua ação carboxílica extremamente reduzida.
- **Inibição da Assimilação Líquida de CO_2 pela Adição de O_2** : o enriquecimento do ambiente com O_2 tende a favorecer a ação da Rubisco como oxigenase, em detrimento da função carboxílica. Todavia, a inibição da FS pelo O_2 é variável sem, contudo, significar que semelhante variação esteja acontecendo também na FR. Além disso, as sínteses de amido e de sacarose limitam a taxa fotossintética, mascarando a sensibilidade da FS à adição de O_2 , sem que se saiba o resultado sobre a FR.
- **Razão de Assimilação $^{14}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$** : esse método baseia-se no suprimento de $^{14}\text{CO}_2$ à atmosfera durante poucos segundos. Nessas condições, os compostos metabólicos do ciclo de oxidação fotossintética do carbono não irão conter ^{14}C , permitindo obter-se uma correlação direta entre suprimento e uso do ^{14}C na carboxilação (fotossíntese bruta - Fsb). Medindo-se então a fotossíntese líquida (FSl) com analisador IRGA, tem-se que $\text{FR} = \text{Fsb} - \text{FSl}$. A limitação maior dessa abordagem repousa sobre o valor a Fsb, visto que a atividade específica do CO_2 nos sítios da carboxilação não pode ser calculada com precisão, em virtude da reciclagem de CO_2 nos espaços intercelulares, a qual é causada pela FR. Outra dúvida são as evidências experimentais que demonstram existir discriminação isotópica da Rubisco contra o ^{14}C .

27.3. Estimativa da FR por meio de Equações

Uma equação que tem tido grande aceitação pelos pesquisadores é a seguinte:

Equação 1 (Laing et al., 1974):

$$v_o = V_o \cdot \frac{O}{O + K_o \left(1 + \frac{C}{K_c}\right)} \cdot \frac{R}{R + K_r}$$

Por causa das limitações na determinação de alguns componentes, outra equação foi proposta, baseada em técnicas avançadas de análise de trocas gasosas. O parâmetro *gamma-estrela* (Γ_*) foi definido como o ponto de compensação (ou seja, a única liberação de CO_2 acontece via FR).

Equação 2 (Farquhar & Von Caemmerer, 1982):

$$\Phi = \Gamma_*/C$$

Em razão da complexidade para se atingir o valor de Γ_* , Brooks & Farquhar (1985) determinaram Γ_* para várias temperaturas (em espinafre) e definiram um cálculo para o valor estimado Γ_*' ($\mu\text{L.L}^{-1}$), do qual o Γ_* pode ser obtido, desde que a pressão atmosférica (P, expressa em MPa) seja conhecida e a concentração de O_2 no ar seja de 21%.

Equação 3 (Brooks & Farquhar, 1985):

$$\Gamma_* = 42,7 + 1,68 (T - 25) + 0,0012(T - 25)$$

Equação 4 (Brooks & Farquhar, 1985):

$$\Gamma_* = \Gamma_*' \cdot P$$

Determinando-se Γ_* (equações 3 e 4), chega-se ao valor de Φ (equação 2), desde que o teor de CO_2 no ar seja conhecido, e daí é possível calcular a FR, medindo-se a taxa fotossintética e a taxa respiratória no escuro, de acordo com a equação:

Equação 5 (Sharkey, 1988):

$$v_o = \frac{A + R_d}{-0,5 + \frac{1}{\Phi}}$$

27.4. Símbolos Usados

A = assimilação fotossintética de CO_2 ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

C = concentração de CO_2 (μbar)

$\Phi = v_o/v_c$ (sem unidade)

Γ_* = ponto de compensação do CO_2 (μbar)

$K_c = K_m$ da Rubisco para o CO_2 ($\mu\text{l.L}^{-1}$)(μbar)

$K_o = K_m$ da Rubisco para o O_2 (ml.L^{-1})(mbar)

K_r = K_m da Rubisco para a RuBP (μM)

O = concentração de O_2 (mbar)

P = pressão atmosférica (bar)

R_d = taxa respiratória no escuro ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

$V_o = V_{\text{max}}$ da função oxigenase da Rubisco ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

v_c = taxa de carboxilação ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

v_o = taxa de oxigenação = duas vezes a taxa de fotorrespiração ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

27.5. Referências Bibliográficas

BROOKS, A.; FARQUHAR, G.D. Effect of temperature on the CO_2/O_2 specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Estimates from gas exchange measurements on spinach. **Planta**, Berlin, v.165, p.397-406, 1985.

FARQUHAR, G.D.; VON CAEMMERER, S. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. eds. **Encyclopedia of Plant Physiology, New Series**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p.459-587.

LAING, W.A.; OGREN, W.L.; HAGEMAN, R.L. Regulation of soybean net photosynthetic CO_2 fixation by the interaction of CO_2 , O_2 and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. **Plant Physiology**, Rockville, v.54, p.678-685, 1974.

SHARKEY, T.D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.73, p.147-152, 1988.

28. FOTOSSÍNTESE E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* - MEDIÇÃO

28.1. Introdução

A necessidade de se conhecer as taxas de FS está bem documentada, visto sua sensibilidade a variáveis ambientais e culturais. Da mesma forma, essas medições se tornam relevantes no exame de genótipos contrastantes ou incidência de parasitas.

Também importante é a fluorescência emitida pela clorofila *a*, nos cloroplastos associados ao PSII, durante o processo de absorção de luz. A cinética circadiana da emissão dessa fluorescência é complexa e depende, primariamente, das mudanças e integridade do sistema de membranas tilaquóides. As características da curva de emissão de fluorescência são modificadas por qualquer ocorrência que influencie o metabolismo fotossintético, sendo um indicador direto dos efeitos ambientais sobre o complexo de captação de luz.

No método tradicional de medição da FS, uma folha é colocada em uma câmara, com passagem forçada de ar a uma taxa conhecida. Por meio da medição da concentração de CO₂ no ar antes e após a passagem na câmara, pode-se medir diretamente a taxa de assimilação de CO₂. A análise de CO₂ em plantas intactas é geralmente conduzida em analisador infravermelho de gás (IRGA). Outro método é o eletrodo Clark, que mede a taxa fotossintética e a fluorescência da clorofila *a* em discos foliares destacados. As duas abordagens são descritas neste capítulo.

28.2. IRGA

28.2.1. Fundamento

- Antes de ocorrer injeção da amostra, o nitrogênio passa através da célula de referência e da célula de amostra, de maneira que o analisador permanece zerado. Para analisar uma amostra, um dado volume de gás é injetado na corrente de nitrogênio, no ponto mostrado (figura 13), por meio de uma seringa. O aumento súbito no nível de CO₂ faz com que a leitura máxima obtida seja menor do que a observada em fluxo contínuo de amostra gasosa. A deflexão do ponteiro indicador e seu subsequente retorno ao zero são rápidos o bastante para representar um pico no registrador potenciométrico.
- Nesse sistema, a leitura obtida do analisador é proporcional à quantidade total (e não à concentração) de CO₂ na amostra. Todavia, mantendo-se o volume da amostra injetada constante, pode-se determinar seu teor de CO₂.
- Para medir a absorção diferencial de energia infravermelha, o instrumento usa um sistema ótico de feixe duplo, contido na seção do analisador (vide diagrama na figura 14). Duas fontes infravermelhas são usadas, sendo uma para o feixe da amostra e a outra para o feixe da referência. Os feixes são bloqueados, simultaneamente, 10 vezes por segundo, pela hélice (lâmina de dois segmentos, girando a 5 rps). Sem bloqueio (figura 14.A), cada feixe passa pela respectiva célula e pelo detector.
- A célula da amostra é um tubo de passagem que recebe um fluxo contínuo de amostra. A célula de referência é um tubo selado que contém o gás de referência, que é selecionado para exibir absorção mínima de radiação infravermelha nos comprimentos de onda absorvidos pelos componentes da amostra nos quais há interesse de estudo.
- O detector é formado por dois compartimentos selados, separados por um diafragma metálico flexível. Cada compartimento possui uma janela para transmissão de radiação infravermelha, que permite a entrada do feixe energético correspondente. Em ambas as câmaras, o componente de interesse é mantido na forma gasosa, sob pressão subatmosférica. Durante a operação, a

presença desse componente na amostra provoca uma diferença de nível energético, entre a seção da amostra e a seção da referência, a qual é detectada, conforme a seguinte seqüência: (a) na célula da amostra, parte da energia radiante original do feixe é absorvida pelo componente de interesse, sem alterações detectáveis na célula de referência; (b) dentro do detector, cada feixe aquece o gás presente na respectiva câmara. Todavia, o gás na câmara da referência apresenta maior aumento de temperatura, por apresentar maior energia líquida; (c) o maior aquecimento da câmara de referência aumenta sua pressão acima dos níveis observados na câmara da amostra; e (d) essa pressão distende o diafragma em direção à câmara da amostra. Portanto, o incremento energético é gasto na flexão do diafragma.

- Essa flexão é medida em unidades de capacitância. O diafragma e o botão estacionário adjacente constituem um capacitor. O afastamento do diafragma do botão estacionário (causado pela flexão) reduz a capacitância.

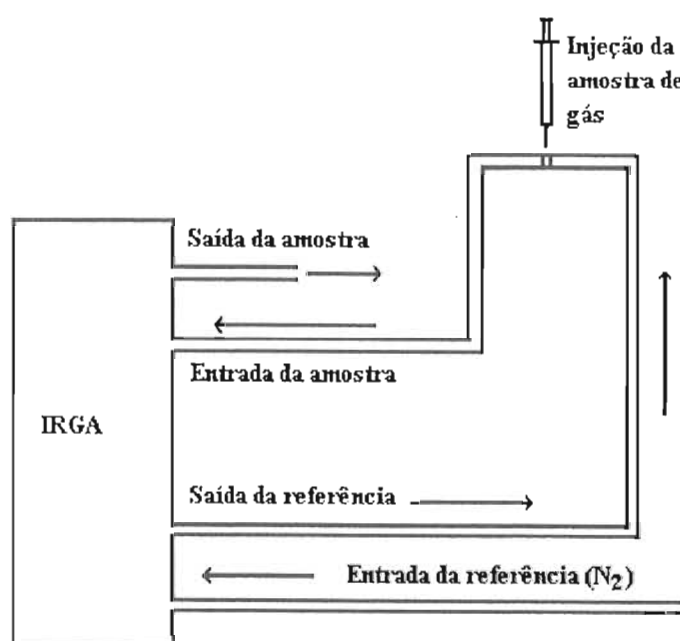


FIGURA 13. Esquema geral da medição de FS em que se usa o IRGA.

28.2.2. Procedimento Tradicional

- Coloque uma folha dentro da câmara de amostra, sob condições apropriadas de luminosidade, e sele a câmara.
- Ligue o ventilador e recolha uma amostra do ar da câmara com uma seringa (pelo menos 10 mL de ar). Imediatamente introduza a seringa em uma relha de borracha, para prevenir vazamentos. Repita o procedimento mais duas vezes, anotando o intervalo entre amostragens, em s).
- Analise as amostras no aparelho.
- Determine a área da folha amostrada (ex. desenhe o contorno da folha em papel milimetrado e conte os quadrados, expressando os valores em m²).
- Determine, usando a curva de calibração, a concentração de CO₂ nas amostras gasosas (em ppm).

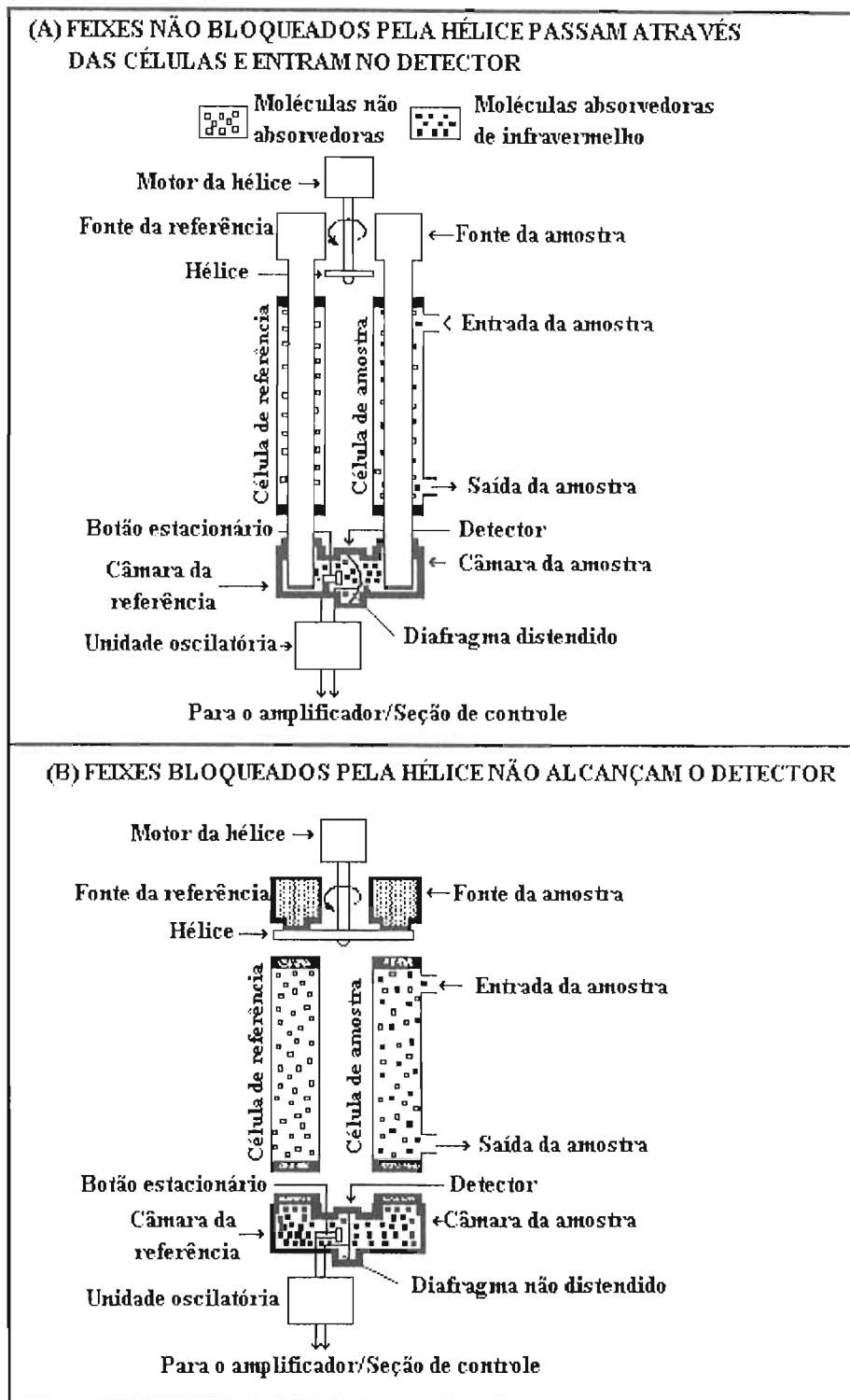


FIGURA 14. Diagrama simplificado de um analisador infravermelho de gás (IRGA).

F. Determine a alteração na concentração, para um dado lapso de tempo ($= \Delta \text{ppm}/\text{tempo}$).

G. Expresse $\Delta \text{ppm}/\text{tempo}$ como $\Delta \text{mole}/\text{tempo} \times 22.400 \text{ cm}^3$, com base nas seguintes considerações:

- a) De acordo com a lei dos gases perfeitos ($PV = nRT$), a 273°K (0°C) e 1 atm de pressão, a pressão de 1 mole de gás ocupa 22,4 L. Visto que existem 1 milhão de $\mu\text{moles.mole}^{-1}$, 1 ppm = $1 \mu\text{mole.mole}^{-1}$. Portanto:

$$1 \text{ ppm} = 1 \mu\text{mole.mole}^{-1} \cdot \frac{1 \text{ mole}}{22.400 \text{ cm}^3} = \frac{1 \mu\text{mole}}{22.400 \text{ cm}^3}$$

- b) Visto que a temperatura não é 0°C, uma correção deve ser feita para temperatura (o erro por causa da pressão é desprezível). Logo:

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mole}/22.400 \text{ cm}^3 = 273 \text{ K/K do ambiente}$$

- H. Multiplique o valor de 09 pelo volume da câmara, para obter a estimativa da mudança em μmoles na câmara, conforme:

$$\frac{\Delta \mu\text{moles}}{\text{tempo} \cdot 22.400 \text{ cm}^3} \cdot \text{volume da câmara em cm}^3 = \mu\text{moles assimilados.tempo}^{-1}$$

- I. Divida o valor encontrado pela área foliar, para expressar os dados em $\mu\text{moles.m}^{-2}$. O PM do CO_2 é 44 g.mole^{-1} . Calcule a taxa fotossintética em $\text{mgCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

28.3. Sistema IRGA com Microprocessador

- Esse aparelho tem sido muito empregado (ex. Nicolodi et al. 1988, Dias-Filho 1995 e Liu et al. 1995) e consiste de um analisador de CO_2 , um console e um compartimento de sensores, com câmara de amostra trocável (opções de 0,25; 1,00 ou 4,00 L de capacidade). O analisador é calibrado para a faixa de 0-1.500 ppm e a circulação do ar é forçada por meio de uma bomba. O console é um microprocessador que gerencia os dados (*logging*, armazenamento, cálculos e comunicação com impressora ou computador). O sistema possui ainda sensores para temperatura (da folha e do ar), U.R. e *quantum*. A presença de baterias recarregáveis assegura seu uso em condições de campo.
- O aparelho apresenta o seguinte modo de operação:
 - O ar é retirado da câmara da amostra (contendo a folha), passa através do analisador e retorna à câmara da amostra, fechando o circuito. No analisador, o ar passa por dois caminhos paralelos: (a) rota com dessecante, para respostas rápidas no medidor do fluxo (1 s); e (b) rota de escape, com uma válvula que desvia o fluxo do dessecante e do medidor de fluxo. Isso permite controle proporcional do fluxo de ar através do dessecante, sem afetar o fluxo total do sistema e a rapidez de resposta. Variando a taxa de passagem do ar pelo dessecante, pode-se manter a U.R. da câmara da amostra constante.
 - Para medir a taxa de troca líquida de CO_2 , uma folha é colocada em câmara hermética e a taxa de mudança na concentração de CO_2 é monitorada em um curto espaço de tempo (10-20 s). A taxa de FS líquida é então calculada pelo microprocessador, usando essa taxa de mudança de concentração e outros fatores, tais como área foliar, volume da câmara e temperatura. Erros ficam, tipicamente, abaixo de 0,2 ppm.
- A medição da condutância estomática é conduzida da seguinte forma:
 - A U.R. da câmara da amostra aumenta, à medida que a folha transpira. Esse aumento é compensado pela entrada de ar parcialmente seco, procedente do analisador. A taxa transpiratória é calculada a partir da mudança da U.R. dentro da câmara, em razão do tempo, e da porção do fluxo total que passa através do dessecante. A taxa transpiratória e as

temperaturas do ar e da folha são usadas para calcular a resistência total da folha, da qual a BL é subtraída, resultando no valor de resistência e condutância dos estômatos.

- A fração de moles de CO₂ presente na fase gasosa pode ser estabelecida com margem de erro < 1%. usando CO₂ puro (99,99%) e um cilindro volumétrico misturador para calibração de gás. Este é usado para misturar padrões e compará-los a gases comerciais. Assim, o valor da concentração de gases mais baratos, não calibrados, pode ser corrigida.

CUIDADOS

- O analisador de CO₂, o sensor de U.R. e o medidor de fluxo requerem calibração periódica. Geralmente, o fornecedor recomenda que o sistema completo seja remetido anualmente à fábrica ou ao representante autorizado, para calibração e manutenção.
- O zero e a amplitude do analisador de CO₂ devem ser verificados diariamente. Embora o analisador forneça gás livre de CO₂, um tanque com CO₂ puro é necessário para ajustar a amplitude. O nível de CO₂ deve estar entre 500 e 1.000 ppm.
- A calibração de fábrica do sensor de U.R. deve ser verificada diversas vezes ao ano, usando-se um psicrômetro ou higrômetro de ponto de orvalho.
- O dessecante deve ser de perclorato de magnésio **anidro** granulado, por apresentar pouca interação com o CO₂. Outros dessecantes, como sílica-gel e sulfato de cálcio não devem ser usados, porque interagem com o CO₂.

- A calibração apresenta os seguintes passos:
 - A. Elimine o CO₂ do cilindro, coloque CO₂ seco e faça a selagem. A seringa, com o êmbolo puxado, extrai um volume determinado de CO₂ de uma fonte de fornecimento.
 - B. Empurre o êmbolo da seringa, para injetar o conteúdo no cilindro, o qual irá se misturar ao gás existente. Ex: 300 µL de CO₂ puro, injetado em 1 L de gás livre de CO₂ produz uma mistura que contém 300 ppm de CO₂.
 - C. Conecte a entrada frontal do cilindro ao analisador e force a saída da mistura gasosa.

OBSERVAÇÃO

- Os dados coletados ficam armazenados na memória do aparelho, em páginas numeradas. Tipicamente, o programa oferece uma marcha padronizada para as manipulações e aplicativos adicionais, que permitem ao usuário selecionar funções de sua preferência, tais como definição de teclas, colocação de códigos para execução de tarefas programadas, conexão a sensores adicionais, delineamento do formato de saída dos dados, edição dos dados armazenados e controle externo, para operação remota por computador (com uso de de conector RS-232C e programa de comunicações).

28.4. IRGA Acoplado ao Cabeçote do Sensor

- Nesta recente modalidade, a bancada ótica do analisador é aberta diretamente para o volume da mistura da câmara da amostra, onde a folha está posicionada. Conseqüentemente, não há tubulação de retorno (entre a câmara da amostra e o *console*), eliminando o tempo de espera que pode confundir correlações que envolvem a troca gasosa e mudanças ambientais. Essa

característica também elimina o lapso de tempo requerido para equilíbrio por causa da adsorção de vapor nas paredes dos tubos.

- O aparelho possui analisadores de rota dupla que medem as concentrações absolutas de CO_2 e H_2O continuamente, eliminando considerações sobre as entradas gasosas. Portanto, os analisadores da referência e da amostra podem ser comparados a qualquer momento, manual ou automaticamente, sem alterar as condições existentes na câmara da amostra.

28.5. Fotossíntese e Fluorescência da Clorofila a em Sistema com Eletrodo Clark

- Por monitorar a produção ou consumo de O_2 em uma câmara vedada, contendo um disco ou segmento foliar, o eletrodo Clark (Delieu & Walker 1972, 1981) permite a medição da FS e da respiração (ex. Adhikary et al., 1990). Visto que os cloroplastos são mantidos saturados sob alta concentração de CO_2 , a medição não é influenciada pelo fechamento dos estômatos. A temperatura é mantida constante, por meio de circulação de água. O aparelho é calibrado pela injeção de um volume conhecido de ar dentro da câmara da amostra e da medição da variação na saída de corrente elétrica.
- A fluorescência da clorofila a (Delieu & Walker, 1983) é simultaneamente monitorada através de janela lateral, usando-se uma fonte luminosa, detector e filtro apropriado (figura 15). O equipamento é utilizado para comparar as respostas fotossintéticas em genótipos contrastantes e para verificar os efeitos de estresses ambientais, dentre outros usos (ex. Nicolodi et al. 1988, El-Sheekh 1993, Portes & Magalhães 1993 e Koroleva et al. 1994).

28.5.1. Descrição Geral

- **Eletrodo Clark:** o catodo de Pt é montado em uma redoma de *araldite*, por meio da qual uma membrana de *Teflon* é esticada.
- **Câmara da amostra:** feita de alumínio anodizado, permitindo controle da temperatura por circulação de água.
- **Luz actínica:** lâmpada 12 V, 150 W com refletores parabólicos internos, que favorecem a luz visível, com filtração de calor adequada; ou LED de densidade máxima de fluxo de fótons, ao nível do disco foliar, de $235 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (medida com sensor quântico) e pico em 660 nm.
- **Calibração:** a câmara é saturada com N_2 , ar ou outra mistura gasosa. Então, a diferença entre o sinal elétrico do eletrodo no ar e no N_2 é aceita como uma medida da pressão parcial de O_2 na atmosfera. Para precisão absoluta, a pressão barométrica deve ser considerada.

28.5.2. Operação Típica

- A. Coloque a amostra, feche a câmara hermeticamente e faça a calibração. Para a curva de calibração, coloque 400 μL de solução de ditonito de sódio sobre a cobertura de espuma de borracha do eletrodo. Após aspiração da solução, faça a leitura, que refletirá a concentração de O_2 na atmosfera (21%).
- B. Espere pelo equilíbrio térmico (2-3 min), em que uma assimilação aparente de O_2 é registrada. Mantenha a temperatura a 20°C . Vários autores deixam o tecido incubado na câmara por 20-30 min, sem iluminação. Em seguida, a luz é ativada e os dados registrados na memória do *console*, ou em registrador potenciométrico.
- C. Abra o disparador, iniciando a evolução do O_2 . A fluorescência registrará um aumento inicial e depois começará a decair. Essa dissipação é registrada.

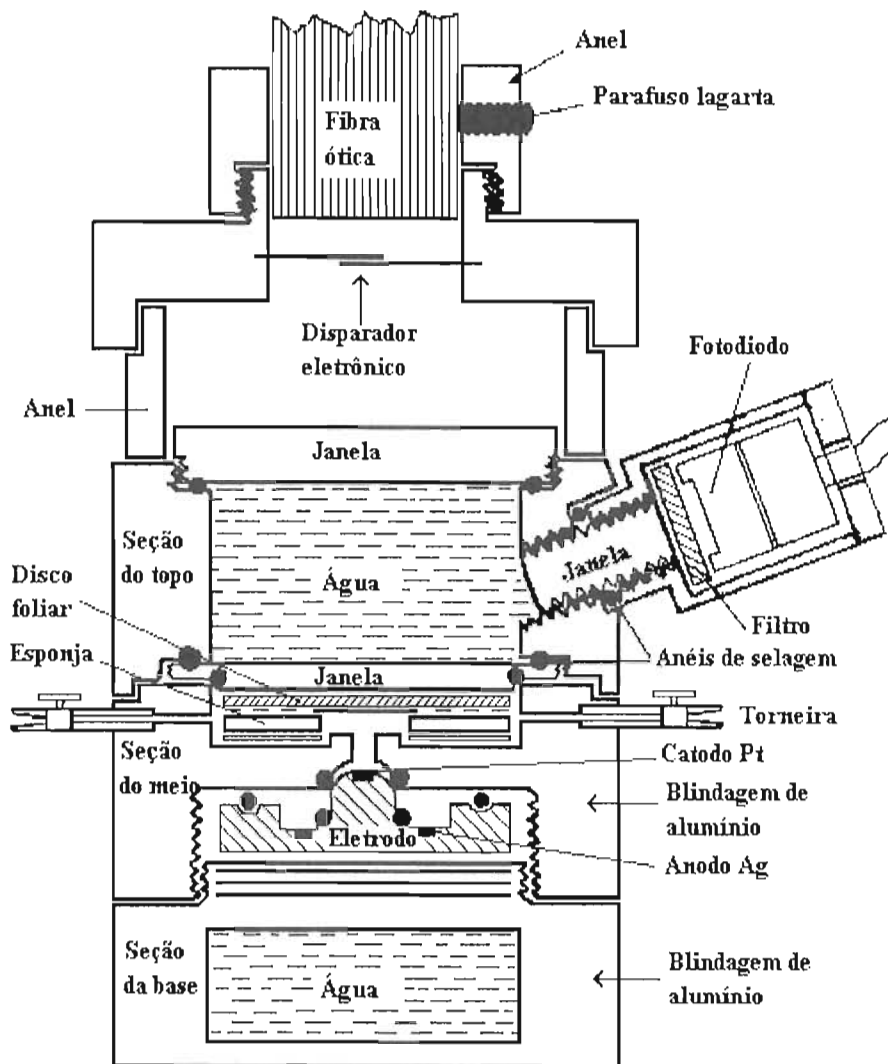


FIGURA 15. Diagrama do conjunto eletrodo Clark-sonda para medição da fluorescência. O disco foliar se apóia sobre uma tela de aço inoxidável. O eletrodo se situa abaixo da câmara da amostra, com seu catodo de Pt exposto à atmosfera da mesma. O tecido foliar é pressionado levemente contra o teto da câmara por um disco de espuma de borracha, o qual também separa a amostra do tampão de carbonato-bicarbonato presente no tubo capilar de junção. O tecido é iluminado pela janela lateral, a qual também permite que a fluorescência atinja a sonda (inserida em ângulo de 40°), onde é monitorada por um fotodiodo. A luz actínica azul é proporcionada diretamente ou através de fibra ótica (topo do diagrama), com ativação por disparador eletrônico. O fotodiodo é protegido da luz actínica por um ou mais filtros. As torneiras laterais são para calibração e ajustes da fase gasosa (adaptado de Delieu & Walker, 1983).

OBSERVAÇÃO

- Se a quantidade de ar injetada na câmara da amostra for pequena (10 µL), a resposta inicial do eletrodo será registrada em 1,5 s e a mudança na taxa de evolução de O₂ (em resposta a variações na intensidade luminosa) será detectada em menos de 2 s.
- Em estudos da dissipação da fluorescência em resposta a estresse, a medição é conduzida por, aproximadamente, 10 min.

28.6. Referências Bibliográficas

- ADHIKARY, S.P.; MURAKAMI, A.; OHKI, K.; FUJITA, Y. Photoregulation of respiratory activity in the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714: the possibility of the simultaneous regulation of the amount of PSI complex and the activity of respiratory terminal oxidase in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.31, p.527-532, 1990.
- DELIEU, T.J.; WALKER, D.A. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. **New Phytologist**, Cambridge, v.71, p.201-225, 1972.
- DELIEU, T.J.; WALKER, D.A. Polarographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs. **New Phytologist**, Cambridge, v.89, p.165-178, 1981.
- DELIEU, T.J.; WALKER, D.A. Simultaneous measurement of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence from leaf pieces. **Plant Physiology**, Rockville, v.73, p.534-541, 1983.
- DIAS-FILHO, M.B. Physiological responses of *Vismia guianensis* to contrasting light environments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.7, p.35-40, 1995.
- EL-SHEEKH, M.M. Quenching of the variable fluorescence induced by zinc in the green alga *Chlorella fusca*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, p.1-5, 1993.
- KOROLEVA, O.Y.; BRÜGGEMANN, W.; KRAUSE, G.H. Photoinhibition, xanthophyll cycle and in vivo chlorophyll fluorescence quenching of chilling-tolerant *Oxyria digyna* and chilling-sensitive *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.92, p.577-584, 1994.
- LIU, L.; GITZ, D.C.; McCLURE, J.W. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p.725-733, 1995.
- NICOLODI, C.; MASSACCI, A.; DI MARCO, G. Water status effects on net photosynthesis in field-grown alfalfa. **Crop Science**, Madison, v.28, p.944-948, 1988.
- PORTES, T. de A.; MAGALHÃES, A.C.N. Análise comparativa de diferentes genótipos de feijão através da medição da fluorescência da clorofila *a* e do balanço de O₂. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, p.17-23, 1993.

29. ENZIMAS I - PURIFICAÇÃO DA FOSFATASE ÁCIDA

CUIDADOS

- Mantenha as preparações sob baixa temperatura, para reduzir a desnaturação e a ação de enzimas proteolíticas.
- Evite agitação violenta de preparações enzimáticas. A formação de espuma significa desnaturação e perda da atividade.
- Trabalhe rápido e evite contaminar a suspensão enzimática.

29.1. Introdução

O estudo de enzimas é fundamental em fisiologia vegetal, visto que, praticamente, todas as respostas da planta envolvem processos metabólicos, os quais são regulados por diversos complexos enzimáticos. Atualmente, numerosas marchas para purificação e determinação da atividade de enzimas estão disponíveis, com variados graus de refinamento. Para descrições pormenorizadas de fundamentos e métodos, o leitor deve consultar Jackoby (1971), Deutscher (1990), Eisenthal & Danson (1992) e Passonneau & Lowry (1993). No presente trabalho, foram selecionadas algumas técnicas, as quais se encontram descritas neste capítulo e também nos capítulos 30, 31, 32 e 33. A nomenclatura enzimática em português é a adotada por Lehninger (1986).

A fosfatase ácida é uma enzima hidrolítica, presente em várias partes da planta. Recentemente, é grande a tendência de se usar o *immunoblotting* protéico para sua detecção e análise quantitativa (ex. Haraguchi et al., 1990). As técnicas de fracionamento indireto (pelas quais as outras enzimas são separadas da fosfatase ácida) também permitem sua purificação. Essa estratégia (adaptada de Misuta & Suda, 1980) é abordada neste capítulo.

29.2. Homogeneização da Amostra

- A. Prepare o tampão de extração com a seguinte composição: Tris-HCl 50 mM, Na₃EDTA 3 mM e sacarose 1% (p/v), pH 7,2.
- B. Faça a homogeneização de 8 g MV de plântulas de feijão com sete dias, cultivadas no escuro, em gral de porcelana (4°C), com 20 mL de tampão de extração e 0,5 g de areia quartzosa.
- C. Filtre o homogeneizado através de gaze e centrifugue o filtrado a 20.000 x g a 4°C, por 20 min. Conserve o sobrenadante, para medição da atividade enzimática e determinação do teor protéico pelo método de Lowry (capítulo 8).

29.3. Diálise da Amostra

- A solubilidade da maioria das proteínas em soluções aquosas pode ser atribuída à interação hidrofílica entre as moléculas da água e os grupamentos ionizados das moléculas protéicas. Como resultado, essa solubilidade é afetada por qualquer composto que altere a força iônica ou as constantes dielétricas da solução aquosa. Por exemplo, sob temperaturas baixas, a adição de sais, como o PSA, provoca a precipitação de algumas proteínas, enquanto outras permanecem em dissolução. Tal fato se deve aos graus variáveis de solubilidade das várias espécies protéicas em solução.

- A. Calcule, a partir da tabela 11, a quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada ao volume do sobrenadante para obter uma solução com NH_4SO_4 a 55% (p/v). Nesse caso (nível de saturação necessário = 55), serão 351 g de NH_4SO_4 para 1 L de solução de amostra. Visto que a amostra estará em torno de 20 mL, faça os cálculos pertinentes.
- B. Deixe a solução salina repousar por 45 min. Agite, ocasionalmente, para facilitar a dissolução.
- C. Centrifugue a solução a $15.000 \times g$ a 4°C , por 10 min. **Descarte o sedimento e conserve o sobrenadante**, anotando o volume deste último. Este é o 1º nível de saturação.
- D. Consulte novamente a tabela 11, para calcular a quantidade do sal para o 2º nível de saturação a 77% (necessário, por causa das diferenças de solubilidade entre as numerosas proteínas presentes na amostra). A partir do valor 55 na coluna NS, verifique a quantidade do sal adequada para 77% de saturação necessária. Como a linha só possui 75 e 80, faça os cálculos pertinentes. Repita os passos A., B. e C. Após a centrifugação, **conserve o sedimento e descarte o sobrenadante**.

TABELA 11. Níveis de saturação (%) necessários para a diálise.

NS*	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
Quantidade (g) de sulfato de amônio sólido a ser adicionado a 1 L de solução																	
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	239	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

* Nível inicial de saturação.

- E. Umedeça o tubo para diálise, colocando-o em um pequeno volume do tampão de ressuspensão do sedimento (Tris-HCl 10 mM pH 7,2). Uma seção de tubo de diálise com 22 cm de comprimento é suficiente para uma amostra (uma das extremidades deve ser atada por um nó).
- F. Ressuspenda o sedimento, após a centrifugação do passo D., em 8 mL do tampão de ressuspensão (passo E.). Transfira esse volume para o tubo de diálise já umedecido, por meio de pipeta *Pasteur*.
- G. Faça, cuidadosamente, um nó na extremidade aberta do tubo para diálise e coloque-o em um béquer com 300 mL ou mais do tampão de ressuspensão.
- H. Deixe o conjunto em agitação circular lenta no refrigerador, por 90 min. Em alguns casos, há necessidade de maior período de tempo e trocas adicionais do tampão no béquer.
- I. Mantenha a amostra enzimática no tubo para diálise (anote o volume - em torno de 10 mL). Colete e armazene uma alíquota de 1 mL para as determinações do teor protéico e atividade enzimática (elas podem ser feitas de imediato, havendo possibilidade).

29.4. Filtração pelo Gel

- O *Sephadex* é um polímero de polissacarídeo hidrofílico, composto por partículas com poros de tamanho conhecido. Quando colocadas em uma coluna, as partículas podem ser usadas para separar moléculas pelas diferenças no tamanho. As moléculas maiores que os poros não irão penetrar nas partículas, passando pela coluna junto com a fase líquida. Elas, portanto, são as primeiras a serem eluídas.
 - Moléculas menores irão penetrar nas partículas do gel, em intensidade variável, dependendo de seu tamanho e formato. Elas serão eluídas por ordem decrescente de tamanho molecular.
- A. Misture o *Sephadex* com o tampão de ressuspensão, após lavá-lo 2-3 vezes com água destilada, para remoção de partículas finas. Após cada mistura, deixe decantar durante 2-3 min.
 - B. Coloque, cuidadosamente, 12-15 mL do *Sephadex* expandido em uma seringa ou coluna. Certifique-se de que o orifício está tapado com algodão de vidro e mantenha o *Sephadex* hidratado.
 - C. Aplique a amostra enzimática na coluna e deixe que se desloque.
 - D. Lave a solução enzimática na coluna com o tampão de ressuspensão e colete frações de 4 mL cada, na saída da seringa ou coluna. Procure coletar, no mínimo, oito frações.
 - E. Mantenha os tubos de ensaio no gelo, à medida em que forem sendo coletados. Monitore a amostra e as frações, com leituras da D.O. a 280 nm. Faça o ensaio da atividade enzimática.

29.5. Ensaio da Atividade Enzimática

- A. Prepare a mistura substrato-tampão acetato da seguinte forma: adicione 8 mg de fosfato de p-nitrofenila a 10 mL de tampão acetato 0,1 N pH 5,3 (o fosfato de p-nitrofenila estará em concentração de 3 mM).
- B. Adicione 50 μ L da amostra enzimática a 1 mL da preparação substrato-tampão de acetato e coloque os tubos em banho-maria a 30°C, por 5 min.
- C. Termine a reação conduzida no passo A., adicionando 1 mL de NaOH 0,2 N. Faça a leitura das amostras em espectrofotômetro, a 400 nm. Antes, prepare os seguintes padrões de p-nitrofenol: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 e 0,10 μ moles e faça a curva padrão ou regressão (**lembre-se: prepare os padrões com 1 mL da preparação p-nitrofenol-tampão acetato + 1 mL de NaOH 0,2 N**). O branco deve conter 1 mL da preparação substrato-tampão acetato, 50 μ L de água destilada (no lugar da amostra) e 1 mL de NaOH 0,2 N.
- D. Determine o teor protéico da amostra pelo método de Lowry (capítulo 8), empregando amostras de 100 μ L e 0,9 mL de água. Lembre-se de que o branco tem de incluir o mesmo tampão no qual a amostra está dissolvida.

29.6. Atividade Enzimática Relativa ao Teor Protéico

- Visto que a purificação de enzimas envolve a remoção seletiva de outras proteínas, é necessário que se conheça a grandeza da atividade enzimática com relação à quantidade de proteína presente. Por exemplo, o grau de pureza de uma dada enzima, nas diversas frações coletadas, pode ser indicado pela medição da atividade enzimática por miligrama de proteína na amostra (ou seja, a *atividade específica*). Para isso, emprega-se a seguinte expressão:

$$\begin{aligned} \text{Atividade Específica} &= \text{Unidades} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de proteína} \\ &= \mu\text{moles produto formado, ou mudança na D.O.} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de proteína} \end{aligned}$$

- Além disso, deve-se fazer as seguintes determinações:

Atividade Total = Atividade Específica x Total (em mg) de proteínas na fração

Rendimento (%) = (Atividade Total/Atividade Total da Amostra Inicial) x 100

- É necessário que se calcule todos os três valores para cada fração obtida durante a purificação. Um aumento na atividade específica indica que a purificação está em curso. A relevância de um determinado passo da purificação pode então ser avaliada, relativa ao incremento na atividade específica da enzima e no rendimento das frações mais ricas.
- O fracionamento ideal deve propiciar pureza total da enzima. Na prática, contudo, é difícil delinear processos altamente seletivos, havendo necessidade de combinar várias estratégias de purificação.

29.7. Referências Bibliográficas

DEUTSCHER, M.P. **Guide to protein purification: methods in enzymology, v.182.** San Diego: Academic Press, 1990. 894 p.

EISENTHAL, R.; DANSON, M.J. **Enzyme assays: a practical approach.** Oxford: Oxford University Press, 1992. 351 p.

HARAGUSHI, H.; YAMAUCHI, D.; MINAMIKAWA, T. Multiple forms of acid phosphatase in cotyledons of *Vigna mungo* seedlings: Immunological detection and quantitation. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.31, p.917-923, 1990.

JACKOBY, W.B. ed. **Methods in enzymology. v. 26. Enzyme purification and related techniques.** New York: Academic Press, 1971. 648 p.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 1986. 725 p.

MISUTA, S.; SUDA, S. Comparative study of multiple acid phosphatases in cellular fractions of bean hypocotyl. **Annals of Botany**, London, v.45, p.369-382, 1980.

PASSONNEAU, J.V.; LOWRY, O.H. **Enzymatic analysis: a practical guide.** Totowa: Human Press, 1993. 400 p.

30. ENZIMAS II - ATIVIDADE DA ATPase NA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

CUIDADOS

- Observe os mesmos cuidados descritos no capítulo 29.

30.1. Introdução

Vários estudos do transporte iônico através das membranas celulares vegetais estabeleceram os seguintes conceitos (vide Serrano 1983 e Briskin 1995): (a) a absorção ativa de nutrientes em plantas ocorre via co-transporte de prótons; (b) o potencial elétrico da membrana celular e a acidificação externa podem ser explicados pela ocorrência de uma ATPase bombeadora de prótons na membrana citoplasmática; e (c) esta ATPase difere de outros agentes de hidrólise de ATP, tais como ATPase mitocondrial, ATPase vacuolar, fosfatases e ATP difosfatases, pela especificidade absoluta pelo ATP como substrato.

Neste capítulo, é apresentada uma descrição de ensaio para a atividade da ATPase, adaptada de Hodges & Leonard (1974), com uso recomendado para gramíneas. Para técnicas mais avançadas que envolvem o uso de vesículas de membranas, o leitor deve consultar Sze (1985).

30.2. Preparo da Fração de Membrana Citoplasmática

- Faça a germinação e o cultivo das plântulas, por seis dias, em solução CaSO_4 1 mM aerada.
- Colete 30-60 g de raízes com 10-15 cm de comprimento. Lave a amostra três vezes em água destilada (4°C), por 60 min. Faça todas as operações seguintes a 4°C.
- Corte as raízes em segmentos de 10 mm e faça a homogeneização em gral de porcelana com tampão de extração (sacarose 0,25 M, Na_2EDTA 3 mM, DTT 2,5 mM e Tris-MES 25 mM pH 7,2; use 4 mL.g⁻¹ MV), por 10 min.
- Filtre o homogeneizado em uma camada de gaze e centrifugue o filtrado a 13.000 x g, por 15 min.
- Recolha o sobrenadante e centrifugue-o a 80.000 x g, por 30 min. O sedimento obtido é uma preparação impura de vesículas da membrana citoplasmática.

30.3. Purificação

- Ressuspenda o sedimento em 3 mL de solução de sacarose 18% (p/v) em tampão de gradiente (MgSO_4 1 mM, DTT 1 mM, Tris-MES 1mM, pH 7,2), com agitação.
- Separe a solução que contém o sedimento em camadas, por meio do seguinte gradiente de concentração (p/v) de sacarose, dissolvida no tampão de gradiente: 45% (aplique 8 mL), 34% (aplique 8 mL) e 20% (aplique 5 mL). Centrifugue o gradiente a 64.000 x g, por 3 h.
- Remova a banda de membrana celular (entre 34-45% de sacarose), por meio de pipeta *Pasteur* recurvada. Dilua essa fração no tampão de gradiente e centrifugue a 97.000 x g, por 30 min. Essa banda pode ser também removida por sucção no topo do gradiente.
- Dissolva o sedimento obtido no passo C. em 1-2 mL do meio padrão para o ensaio (Tris-ATP 3,33 mM, MgSO_4 3 mM, KCl 50mM, Tris-MES; pH 6,5).
- Determine o teor de proteína da amostra pelo método de Lowry (capítulo 8). Visto que o reagente de Folin reage com o Tris presente no tampão de gradiente, dilua a amostra protéica em

NaOH 0,1 N (ex. 0,1 mL da amostra em 1 mL de NaOH, fazendo-se o mesmo para o branco). Procure obter uma diluição final de 300-500 mg de proteínas da membrana.mL⁻¹.

30.4. Ensaio da ATPase

- A. Adicione 100 µL da amostra (portanto, 30-50 mg de proteínas da membrana) a 1 mL do meio padrão para o ensaio (item 30.3., passo D.).
- B. Mantenha a mistura a 37°C, por 30 min. Termine a reação, adicionando 2 mL de molibdato de amônio acidificado. Faça seis repetições (incluindo, sempre, o branco).
- C. Determine o fosfato inorgânico liberado pela ATPase, misturando, exaustivamente, o meio de ensaio com 0,4 mL de ácido 1,2,4-aminonaftolsulfônico (agente redutor) em misturador *vortex*. Faça a leitura em espectrofotômetro, a 660 nm.

OBSERVAÇÃO

- O branco, composto por 1 mL do meio padrão para ensaio (item 30.3., passo D.), 2 mL de molibdato de amônio e 0,4 mL de ácido 1,2,4-aminonaftolsulfônico, corrige a presença de fosfato endógeno e ocorrência de hidrólise não-enzimática de ATP.

- D. Faça a curva padrão, empregando KH₂PO₄ (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 µmoles.mL⁻¹) como padrão. Ou seja, coloque a D.O. como função da concentração de fosfato. Cada padrão deve conter 1mL da solução de KH₂PO₄, 2 mL de molibdato de amônio e 0,4 mL do agente redutor.

30.5. Referências Bibliográficas

- BRISKIN, D.P. The plasma membrane H⁺-ATPase: biochemistry, transport function and role in plant cell physiology. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Conferências ...** Lavras: SBFV, 1995. p.99-110.
- HODGES, L.H.; LEONARD, R.G. Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. In: FLEISCHER, S.; PACKER, L. eds. **Methods in enzymology**, v.32. New York: Academic Press, 1974. p.392-406.
- SERRANO, R. Purification and reconstruction of the proton-pumping ATPase of fungal and plant plasma membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.227. p.1-8. 1983.
- SZE, H. H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.175-208, 1985.

31. ENZIMAS III - α -AMILASE

CUIDADOS

- Observe os mesmos cuidados descritos no capítulo 29.
- A coloração azul da reação com o iodo desaparece com exposição à luz. Portanto, seja rápido nas leituras da absorbância, após completada a reação. Mantenha essas soluções sob luz difusa, até a leitura.

31.1. Introdução

O endosperma das sementes de algumas gramíneas é um tecido de armazenamento sem vida, exceto pela camada mais exterior, a aleurona. Durante a germinação, após a absorção de água, o embrião e a camada de aleurona são ativados. Após cerca de um dia após absorção de água, o embrião produz um hormônio, geralmente GA, que se transloca para a camada de aleurona, onde induz a síntese de numerosas enzimas hidrolíticas, as quais, por seu turno, são secretadas no endosperma rico em amido. A mais proeminente dessas enzimas é a α -amilase, que hidrolisa o amido, causando a produção de maltose (dissacarídeo), que é um substrato solúvel, disponível para o desenvolvimento do embrião. Neste capítulo, são descritas duas técnicas: uma para a determinação do nível de α -amilase na germinação de sementes de gramíneas e outra para a purificação e caracterização em cotilédones de caupi.

31.2. Determinação em Sementes em Germinação

- Neste método, a atividade da α -amilase é estimada pela taxa de desaparecimento do amido. O nível de amido na amostra é medido pela reação com solução de iodo (Preiss & Kosuge, 1970). Embora seja um método relativamente simples, vale ressaltar que várias gramíneas forrageiras ainda não foram estudadas quanto a este aspecto.

CUIDADOS

- Não é possível prever a quantidade de enzima presente na amostra em um dado momento. Por isso, um pouco de tentativa e erro é necessário no procedimento.
- Ao preparar os extratos, use somente a porção da semente de plântulas germinadas.
- Dilua a amostra, caso a coloração azul esteja muito intensa. Todavia, nem sempre essa alternativa é desejável.

31.2.1. Procedimento

- A. Coloque lotes de sementes para germinar em placas de *Petri* (26°C), em diferentes datas, para obter plântulas em estádios distintos de germinação (faça testes preliminares para selecionar as melhores idades para as análises).
- B. Colete oito plântulas, seque-as com papel absorvente e seccione as respectivas sementes. Homogeneíze as sementes em gral de porcelana (2°C), na presença de 2 mL de tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,06 M; pH 6,8). Após obtenção do homogeneizado, adicione mais 2 mL do tampão.

- C. Transfira, quantitativamente, o homogeneizado para um tubo plástico de centrifugação, usando dois volumes de tampão. Anote os volumes de tampão usados.
- D. Faça a centrifugação a $12.000 \times g$ a $0-4^{\circ}\text{C}$, por 5 min. Preserve o sobrenadante em gelo, para uso no ensaio de atividade.
- E. Pipete, cuidadosamente, vários volumes do extrato (ex. 0,02; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 mL) para uma série de tubos de ensaio e complete o volume para 1 mL. Agite o tubo levemente. Inclua na série uma testemunha, com 1 mL de tampão fosfato.
- F. Adicione, rapidamente, 1 mL de solução de amido e agite levemente. Faça incubação a 25°C (ou temperatura ambiente, anotando a temperatura), por 5 min.
- G. Paralise a reação, adicionando 1 mL de solução de iodo e agitando imediatamente. Adicione a solução de iodo na mesma seqüência usada da solução de amido. O iodo irá reagir com o amido remanescente, gerando coloração azul. Quanto maior a atividade enzimática, maior a hidrólise do amido, e menor a intensidade da coloração azul formada.
- H. Faça a leitura no espectrofotômetro, contra um branco com água, a 620 nm.
- I. Faça a curva padrão, tendo a taxa relativa de reação (diferença entre a absorbância da mistura de reação sem adição do extrato que contém a enzima, e a absorbância da mistura de reação com adição de enzima) como função da concentração relativa da enzima.
- J. Tome várias concentrações da enzima na porção linear da curva e calcule as UA de α -amilase por semente.
- K. Obtenha a curva padrão da seguinte forma:
- Prepare um conjunto de tubos de ensaio que contenha uma série de volumes de solução de amido, na faixa de 0,05 a 1,0 mL.
 - Complete o volume de cada tubo para 2,0 mL, com tampão fosfato.
 - Faça a reação com 1,0 mL de solução de iodo e meça a absorbância.

OBSERVAÇÃO

- Como alternativa, uma série de padrões de α -amilase (disponível comercialmente) poderá ser preparada e colocada para hidrolisar a solução de amido. Após a reação, a leitura da absorbância da série permitirá a confecção de uma curva padrão.

31.2.2. Reagentes

Solução de Amido	Aqueça 50 mg de amido solúvel em 100 mL de tampão fosfato e deixe esfriar.
Solução de Iodo	Dissolva 0,6 g de KI e 0,06 g de I_2 em um mínimo de água (10 mL). O iodo dissolve-se mais rapidamente quando pequenos volumes de solventes são usados. Após dissolução dos cristais, adicione água e HCl, até o volume de 1L, de maneira que a concentração do ácido seja 0,05 N.

31.3. Purificação e Caracterização em Cotilédones

- Essa técnica foi empregada por Bastos et al. (1994) em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).
- Para facilitar consultas, algumas referências citadas pelos autores são apresentadas no texto.

31.3.1. Extração da Enzima

- A. Seccione cotilédones de plântulas com cinco dias, coloque-os em sacos plásticos com pequenas perfurações, congele-os com N₂ líquido e submeta-os à liofilização. Triture as amostras até obtenção de um pó fino. Armazene as amostras em frascos selados que contenham sílica-gel, a 5°C.
- B. Conduza todos os procedimentos seguintes a 0-5°C, a não ser que outras instruções sejam dadas.
- C. Suspensão o pó liofilizado (10 g) em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 5,0 mM, BME 10,0 mM; pH 7,4.
- D. Misture a preparação, intermitentemente, em temperatura ambiente, por 2 h. Filtre a amostra em tela de náilon e centrifugue a 9.000 x g, por 15 min.
- E. Precipite o sobrenadante com solução de sulfato de amônio 30-60% (p/v).
- F. Centrifugue o precipitado (5.000 x g, por 10 min) e ressuspensão o sedimento em tampão acetato 50 mM pH 5,4, com CaCl₂ 1,0 mM.
- G. Faça a diálise contra o tampão e contra água destilada. Centrifugue a amostra a 5.000 x g, por 15 min. Liofilize o sobrenadante, para uso posterior.

31.3.2. Atividade da α -Amilase

- A. Meça a atividade da α -amilase, usando tampão acetato 0,1 M pH 5,4, segundo Bernfeld (1955).
- B. Expresse a atividade enzimática pela diferença de absorbância a 546 nm, ou em UA. Nesse caso, 1 UA é a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol açúcar redutor.min⁻¹.
- C. Determine o teor de proteínas pelo método de Bradford (capítulo 8), usando BSA como padrão.
- D. Determine o teor de açúcares redutores pelo método de Dubois (capítulo 10), usando glicose anidra como padrão.

31.3.3. Cromatografia de Afinidade

- A. Ressuspensão o sobrenadante liofilizado (item 31.3.1., passo G.), em tampão acetato 50 mM, CaCl₂ 1 mM, BME 10 mM; pH 5,4.
- B. Aplique a suspensão em coluna de β -ciclodextrina *Sepharose* 6B (15 x 130 mm), preparada conforme Vretblad (1974) e equilibrada como o mesmo tampão do passo A.
- C. Ajuste o fluxo da coluna para 32 mL.h⁻¹, a 10°C.
- D. Use um coletor de frações automático, ajustado para coletar frações de 5,0 mL por tubo.
- E. Faça a eluição da α -amilase adsorvida, após lavagem com 200 mL do tampão de equilíbrio, usando tampão acetato (passo A.) com adição de β -ciclodextrina (10 g.L⁻¹).
- F. Faça a concentração, a 4°C, das frações que apresentarem maior atividade enzimática, por meio da sua combinação em um saco para diálise acondicionado em caixa de acrílico, contendo PEG 12.000. Mantenha a α -amilase concentrada a -20°C, até uso posterior.

31.3.4. Filtração em Gel

- A. Prepare uma coluna de *Sephadex* G-25 (25 x 280 mm) pela técnica de Robyt & White (1987) e equilibre-a com tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM; pH 7,4. Aplique uma alíquota de 50 mL da amostra de α -amilase (item 31.3.3., passo F.) no topo da coluna e ajuste o fluxo para 32 mL.h⁻¹. Mantenha a temperatura a 10°C.

- B. Use um coletor automático de frações, ajustado para coletar frações de 5,0 mL por tubo. Faça a eluição das frações com o tampão usado no equilíbrio (passo A.).
- C. Combine as frações que apresentarem as maiores atividades de α -amilase. Após diálise contra água destilada a 2°C, liofilize a amostra e armazene a 5°C.

31.3.5. PAGE

- A. Conduza a PAGE (Robyt & White, 1987) em gel de 14 x 13 x 1 cm, com gradiente linear de poli(acrilamida) de 5-20% (p/v). Prepare o gel de concentração com acrilamida 3,75% (p/v).
- B. Suspenda as amostras da α -amilase purificada e liofilizada em tampão Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, adicionando sacarose e azul de bromofenol, para uma concentração final de 10 e 0,005% (p/v), respectivamente.
- C. Aplique a solução enzimática diretamente no gel de concentração, para detectar a atividade da α -amilase no gel.
- D. Conduza a eletroforese a 4°C, usando corrente constante de 12,5 mA, durante 6 h. Use o seguinte tampão de corrida: Tris 10 mM, glicina 76 mM; pH 8,3.
- E. Divida o gel em duas partes iguais. Faça a incubação de uma metade a 30°C, por 90 min, em tampão acetato 50 mM, CaCl₂ 1 mM, amido solúvel 2% (p/v); pH 5,4.
- F. Lave esta metade do gel em água destilada e, por último, faça a imersão da mesma em solução aquosa de I₂ (0,6%, p/v)-KI (6%, p/v), diluída em 1:50 (v/v) com HCl 0,05 N, preparado imediatamente antes do uso.
- G. Faça a coloração da outra metade do gel com azul de Coomassie.

31.3.6. Determinação das Características da α -Amilase

- A. Determine o PM da enzima purificada em SDS-PAGE, empregando um conjunto de marcadores de peso molecular, na amplitude de 12,5 a 92 kD.
- B. Determine a composição de aminoácidos do hidrolisado da enzima, por HPLC, usando um analisador de aminoácidos.
- C. Avalie o efeito do pH sobre a atividade enzimática, fazendo o ensaio da α -amilase purificada, diluída para 10 mg.L⁻¹, em tampão acetato 50 mM, variando o pH de 4,0 a 5,6, e em tampão Tris-HCl 50 mM, variando o pH de 6,0 a 7,6. Adicione CaCl₂ 1 mM aos dois tampões.
- D. Verifique a estabilidade térmica da α -amilase, conduzindo o seguinte estudo:
 - a) Suspenda a enzima purificada em tampão acetato 50 mM, com e sem adição de CaCl₂ 1 mM, para uma concentração protéica final de 20 mg.L⁻¹.
 - b) Faça a incubação de alíquotas de 150 μ L a 70°C, por períodos variáveis, seguida do ensaio de atividade enzimática.
 - c) Determine os valores de K_m aparente e V_{max} pelo método de Conn et al. (1987), usando o amido em concentrações na faixa de 0,5 a 5,0 g.L⁻¹ e uma concentração constante da enzima (5 mg.L⁻¹).

31.4. Referências Bibliográficas

- BASTOS, J.L.P.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Purification and characterization of a cotyledonary α -amilase from cowpea seedling. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.6, p.33-39, 1994.
- BERNFELD, P. Enzymes of carbohydrate metabolism. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 1, p.149-158, 1955.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K.; BRUENING, G.; DOI, R.H. **Outlines of biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p.115-163.

PREISS, J.; KOSUGE, T. Regulation of enzyme activity in photosynthetic systems. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.21, p.433-466, 1970.

ROBYT, J.F.; WHITE, S. **Biochemical techniques: theory and practice**. Monterrey: Brooks/Coll, 1987. p.129-157.

VRETBLAD, P. Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexamylose- β -amylase system. **Federation of European Biochemical Society Letters**, Amsterdam, v.47, p.86-89. 1974.

32. ENZIMAS IV - NITRATO REDUTASE

CUIDADOS

- Planeje a seqüência de ações com antecedência, para que as amostras e reagentes já estejam gelados, no momento de cada manipulação.
- Observe os mesmos cuidados descritos no capítulo 29.

32.1. Introdução

A fonte de nitrogênio mais comum para as plantas é o íon nitrato, o qual é absorvido e reduzido para nitrito (NO_2^-) e, então, para íons de amônia (NH_4^+). Esses processos ocorrem nas raízes e em caules, conforme a espécie e condições ambientais. Os íons de amônia são convertidos em ácido glutâmico e então em centenas de outros compostos orgânicos nitrogenados.

A redução do nitrato é inicialmente catalisada pela nitrato redutase (NR), que transfere dois elétrons do NADH (ou NADPH), produzindo nitrito, NAD^+ (ou NADP^+) e água. Nas plantas superiores, a atividade da NR é, aparentemente, induzida pelo substrato e reprimida por produtos metabólicos nitrogenados, como a amônia e a glutamina (Beevers & Hageman, 1969). Por isso, se as plantas são cultivadas sem nitratos (por exemplo, na presença de íons de amônia), não há requerimento para a NR e o nível desta permanecerá baixo em raízes e partes aéreas. Embora a simples presença de nitrato pareça ser suficiente para a síntese de NR em raízes, as partes aéreas tendem a requerer também luminosidade, para que o processo se inicie (Travis et al., 1970).

Neste capítulo, são apresentadas as seguintes abordagens para a avaliação da atividade da NR: (a) resposta, em gramíneas C_3 , ao nitrato e à luminosidade; (b) determinações com o uso de discos foliares, em gramíneas C_4 ; (c) emprego de inibidores de proteases no tampão de extração; (d) uso da análise de injeção de fluxo (FIA) para a determinação do nitrito; e (e) *immunoblotting* protéico.

32.2. Indução da NR por Nitrato e Luminosidade

- Esse método é uma adaptação (Ross, 1974) da técnica de Travis et al. (1970).

32.2.1. Tratamentos

- A. Cultive plantas de uma gramínea C_3 durante oito dias, na ausência de luz. Irrigue as plantas com solução nutritiva enriquecida com nitrato.
- B. Cultive as plantas durante sete dias na ausência de luz, colocando-as então sob luminosidade contínua durante um dia. Faça irrigação diária com solução nutritiva enriquecida com nitrato.
- C. Cultive as plantas como no passo B., mas faça a irrigação diária sem a presença de nitrato.
- D. Cultive as plantas por sete dias na ausência de luz e com irrigação diária com solução nutritiva que contenha nitrato. Faça a excisão da primeira folha de cada planta e coloque 10 folhas em um tubo com 10 mL de água. Deixe as amostras sob luz contínua, durante um dia.

32.2.2. Preparo do Homogeneizado

- A. Destaque os 10 cm terminais de cada primeira folha formada de 10 plantas e pese esse material.

- B. Esfrie a amostra em gelo e faça todas as manipulações subseqüentes a 4°C.
- C. Seque as folhas, rapidamente, com papel absorvente e homogeneíze a amostra em gral de porcelana, na presença de tampão fosfato 0,2 M, Na₂EDTA 1mM, pH 7,5 (use quantidade equivalente a três vezes o peso da amostra).
- D. Centrifugue a mistura a 27.000 x g, por 15 min. Decante o sobrenadante e mantenha-o em banho de gelo. Este material constitui a solução enzimática para as análises.

32.2.3. Ensaio da Atividade

- A. Adicione a cada tubo, em seqüência, os seguintes volumes: 1,6 mL de solução tamponada de nitrato, 0,15 mL de água destilada e 0,20 mL da solução de NADH. Prepare, para cada tratamento, três tubos de ensaio (duas repetições e um branco).
- B. Inicie a reação, adicionando 50 µL da solução enzimática (item 32.2.2., passo D.) à mistura. Para o branco, substitua a solução enzimática por água destilada. Misture bem, por agitação, e deixe os tubos em temperatura ambiente, por 15 min.
- C. Paralise a reação, adicionando 2 mL de solução corante. Misture bem, por agitação, e deixe os tubos em temperatura ambiente, por 15 min. A intensidade da cor rosa proporciona uma medida do nitrito formado a partir do nitrato.
- D. Meça a absorbância a 540 nm. Prepare a curva padrão, ou regressão linear na calculadora, colocando os valores de D.O. como função da concentração de padrões de nitrito (0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 µmoles) em volume final de 4 mL, após adição de 2 mL da solução corante.

OBSERVAÇÃO

- Alguns autores (ex. Nakagawa et al., 1985) expressam os dados em UA. Nesse caso, 1 UA equivale à conversão de 1 nmol de nitrato para 1 nmol de nitrito, por minuto.

32.2.4. Reagentes

Solução Tamponada de Nitrato	a) Misture 12 mL de tampão fosfato 1 M pH 7,5, 60 mL de solução KNO ₃ 0,1 M, 12 mL de solução Na ₂ EDTA 1mM, 48 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7,5-8,0 e 300 mL de água destilada. b) Ajuste o pH da mistura para 7,5, com H ₂ SO ₄ e então complete o volume, com água, para 480 mL. Embora essa solução possa ficar na temperatura ambiente, ela deve ser armazenada a -4°C, visando prevenir o crescimento de microrganismos.
Solução de NADH	a) Dissolva 14 mg de NADH em 5 mL de água destilada. b) Adicione 200 µL de NaOH 0,05 N, para mantê-la alcalina e prevenir sua destruição. A solução pode ser armazenada a 4°C, por 3-4 dias. Ela não deve ser congelada.
Solução Corante	Misture, imediatamente antes do uso, partes iguais de sulfanilamida 1% (p/v, em HCl 1,5 N) e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,02% (p/v, em água). Essas duas soluções devem ser armazenadas em frascos opacos, a 4°C.

32.3. Determinação da Atividade da NR em Discos Foliares

- Esse método foi empregado em milho (Purcino et al., 1994), seguindo as recomendações de Hageman & Reed (1980).
 - A. Faça a incubação de 0,5 g de discos foliares em 20 mL de um meio de reação, constituído de K_2HPO_4 0,1 M pH 7,5, KNO_3 0,1 M, propanol 1% (v/v) e *neutronix* 0,05% (v/v), a 30°C. em banho-maria com agitação, na ausência de luz, por 10-40 min.
 - B. Paralise a reação, adicionando sulfanilamida 1% (p/v) dissolvida em HCl 1,5 N.
 - C. Retire alíquotas de 0,5 mL, adicione dicloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,02% (p/v) a cada uma delas e determine o nitrito produzido, por leitura da absorbância a 540 nm.

32.4. Uso de Tampão de Extração que Contém Inibidores de Proteases

- Essa abordagem visa prevenir degradações da NR, que tendem a se iniciar assim que as amostras começam a ser manipuladas. Sivasankar & Oaks (1995) propuseram o uso do seguinte tampão (a 4°C):
Tris-HCl 25 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, FAD 20 μ M, DTT 1 mM, BSA 1% (p/v) e cisteína 10 mM. Como inibidores de proteases a serem dissolvidos no tampão de extração, a cimostatina é adicionada, a 10 μ M, dissolvida em DMSO, para as amostras de raízes, e a leupeptina, a 10 μ M, para as amostras de brotações.

32.5. Determinação do Nitrito por meio de FIA

- Davis & Radke (1985) adaptaram o uso do FIA (figura 16) para a determinação do nitrito, com as seguintes características:
 - As soluções-estoque dos diversos reagentes são diluídas em 1:1, com água, e carregadas em seringas de 50 mL.
 - Os reagentes são misturados, imediatamente, em frente à entrada para injeção da amostra.
 - Os dados são gerados por uma reação (a 80°C) em série repetitiva, de volumes de 360 μ L, perfazendo 1,18 mL a cada 25 s.
 - Nesse método, a margem de erro é inferior a 1 nmol, com um pico de 0,06 por nmol injetado.
 - As amostras podem ser injetadas a cada minuto, proporcionando um ensaio rápido para a atividade da NR.
 - O analisador de FIA geralmente possui um fotômetro com cubeta de 10 mm para passagem do fluxo. Nos modelos mais recentes, a fonte luminosa é um LED, cobrindo, tipicamente, os seguintes comprimentos de onda: 555; 570; 605; 635 e 660 nm.
 - Toda medição feita com FIA é relativa. Por isso, o sistema requer uma solução-padrão para comparações. A análise da altura do pico (medida em mV) é o método mais comum de análise. Ela é medida com relação à linha do zero do detector. A área do pico também pode ser determinada, por cálculo integral.

32.6. Immunoblotting Protéico

- Shiraishi et al. (1992) empregaram o *immunoblotting*, com anticorpos desenvolvidos contra NR purificada por eletroforese, para demonstrar que a síntese de NR é inibida, em células de

espinafre cultivadas *in vitro*, pela adição de glutamina ao meio. Apesar da atividade da NR ser determinada por processo similar ao já discutido, o procedimento geral envolve maior grau de refinamento e depende de aparelhagem mais avançada, preferencialmente, com interface para computador. Basicamente, o método possui as seguintes características:

- O método depende do preparo de um anticorpo contra NR de folhas de espinafre, pela técnica de Sueyoshi et al. (1989). A fração IgG é obtida do soro de fracionamento em coluna de proteína tipo A-Sepharose CL 4B.
- Alíquotas dos extratos homogeneizados são misturadas com tampão da amostra (Laemmli, 1970), em quantidade equivalente a duas vezes o peso da alíquota tomada.
- Após fervura, as amostras são aplicadas a um gel de poliacrilamida 10% (p/v) com 1 mm de espessura (capítulo 7) e submetidas à eletroforese.

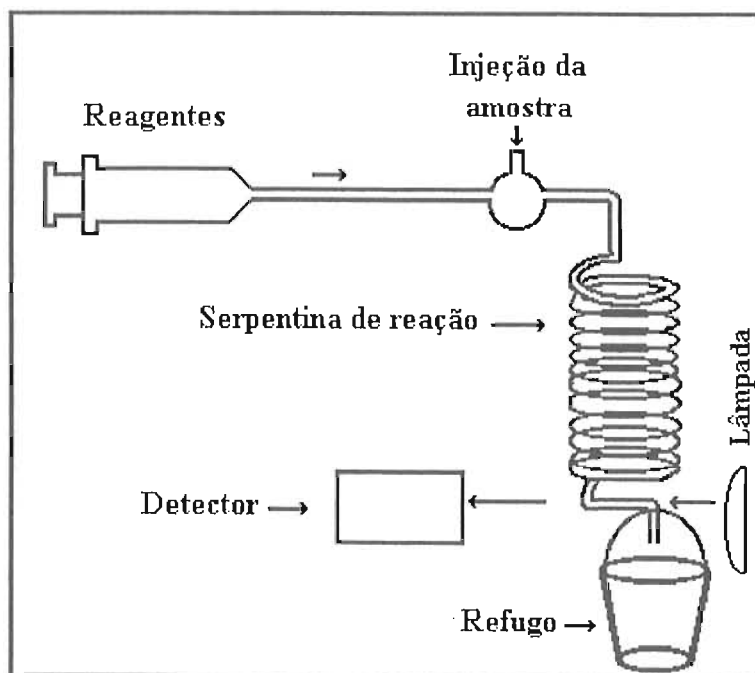


FIGURA 16. Diagrama geral de uma análise de injeção de fluxo (FIA). Adaptado de Davis & Radke (1985).

- Terminada a corrida, as proteínas no gel são transferidas para um filtro de nitrocelulose, por meio de *electroblotting*, sob corrente constante de 90 mA, durante 12 h (método de Maki et al., 1986). O filtro é então bloqueado em solução de leite desnatado 5% (v/v) em tampão fosfato salino (fosfato de potássio 100 mM, cloreto de sódio 150 mM; pH 7,5).
- Em seguida, o filtro é revelado com anticorpos contra NR, em diluição 1:2.000, e tratamento com anticorpos conjugados à peroxidase extraída de rabanete silvestre (*Cochlearia armoracia*), desenvolvidos em carneiros, contra o IgG de coelho (produto disponível comercialmente).
- Segue-se uma incubação com 3,3'-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio, após a qual a intensidade das bandas reveladas no filtro de nitrocelulose é revelada por esquadrinamento

em densitômetro. A intensidade da cor da banda é diretamente relacionada à quantidade de proteína na membrana de nitrocelulose.

32.7. Referências Bibliográficas

- BEEVERS, S.L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p.495-522, 1969.
- DAVIS, L.C.; RADKE, G.A. Flow injection analysis for almost anything. In: RANDALL, D.D.; BLEVINS, D.G.; LARSON, R.L. eds. **Current topics in plant biochemistry and physiology**. v.4. Columbia: University of Missouri, 1985. p.235.
- HAGEMAN, R.H.; REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. **Methods in Enzymology**. San Diego, v.69, p.270-280, 1980.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- MAKI, H.; YAMAGISHI, K.; SATO, T.; OGURA, N.; NAKAGAWA, H. Regulation of nitrate reductase activity in cultured spinach cells as studied by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.739-741, 1986.
- NAKAGAWA, H.; YONEMURA, Y.; YAMAMOTO, H.; SATO, T.; OGURA, N.; SATO, R. Spinach nitrate reductase. Purification, molecular weight and subunit composition. **Plant Physiology**, Rockville, v.77, p.124-128, 1985.
- PURCINO, A.A.C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A.T.; MARRIEL, I.E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.6, p.41-46, 1994.
- ROSS, C.W. **Plant physiology laboratory manual**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1974. 200 p.
- SHIRAISHI, N.; SATO, T.; OGURA, N.; NAKAGAWA, H. Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultured spinach cells. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.33, p.727-731, 1992.
- SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Regulation of nitrate reductase during early seedling growth. A role for asparagine and glutamine. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.1225-1231, 1995.
- SUEYOSHI, K.; OGURA, N.; NAKAGAWA, H. Identification of possible intermediates in in vivo degradation of spinach nitrate reductase. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokyo, v.53, p.151-156, 1989.
- TRAVIS, R.L.; JORDAN, W.R.; HUFFACKER, R.C. Light and nitrate requirements for induction of nitrate reductase activity in *Hordeum vulgare*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 23, p.678-685, 1970.

33. ENZIMAS V - ELETROFORESE DE ISOZIMAS EM GEL DE AMIDO

CUIDADOS

- Observe os mesmos cuidados descritos no capítulo 29.
- Certifique-se de que a emulsão de amido está homogênea.
- A eletroforese em poliacrilamida está descrita no capítulo 7, sendo aplicável a isozimas.

33.1. Introdução

As proteínas são úteis para estudos genéticos diretos, por serem os produtos primários de genes estruturais. Mudanças na seqüência de bases codificantes se refletem, com muita freqüência, em mudanças na estrutura primária das proteínas. A eletroforese sob condições nativas (baixa temperatura e pH 7,0-8,5) detecta até mesmo uma única substituição de aminoácido na estrutura protéica. Visto que o extrato bruto usado contém vários tipos de proteínas, corantes específicos devem ser usados para a detecção.

O termo *isozima* (Markert & Moller, 1959) refere-se a diferentes formas moleculares de uma enzima, apresentando a mesma especificidade por substrato. Normalmente, as isozimas são particulares para uma dada espécie, em um dado tecido e em um dado estágio de desenvolvimento. Por isso, podem ser usadas, em muitas situações, como marcadores para a separação de genótipos contrastantes. Podem também ser usadas para detectar enfermidades (Farkas & Stahmann, 1966) ou respostas a reguladores do crescimento (Varner & Chandra, 1964), por causa das alterações que apresentam. Neste capítulo são apresentados, de forma resumida, métodos (Shields et al., 1983) para a extração e separação eletroforética de isozimas vegetais. Para outros sistemas isozimáticos, o leitor deve consultar Vallejos (1983).

33.2. Recursos Necessários

- Água destilada e/ou deionizada, especialmente para preparo dos tampões
- Fonte de vácuo
- Refrigerador
- Fonte de energia, de até 40 watts (400 V, 100 mA)
- Placa de aquecimento ou forno de microondas, para aquecer as soluções de amido
- Luvas grossas, para manuseio dos frascos aquecidos
- Medidor de pH
- Balança, com capacidade de 10 a 1.000 mg
- Sistema de montagem de géis: vertical para a SDS-PAGE e horizontal para o amido
- Frascos volumétricos, para medição, mistura, aquecimento e aplicação do tampão
- Frascos de sucção, para remoção de gases, antes da coloração dos géis

33.3. Eletroforese em Gel de Amido

33.3.1. Preparação do Gel

- Os sistemas tampões dependem das isozimas a serem coradas, assim como da espécie em estudo (vide tabelas 12 e 13).

TABELA 12. Exemplos de isozimas e sistemas tampões para algumas espécies vegetais (adaptado de Shields et al. 1983).

ISOZIMA	CÓDIGO	TAMPÃO*	ESPÉCIE
Ácido Indolacético Oxidase	IAAOX	S	Rabanete Silvestre
Aconitase	ACO	B, D, G	Coníferas, Soja
Adenil Quinase	AK	I	Coníferas
Alanina Transaminase	GPT	H	Coníferas
Aldolase	ALD	G	Coníferas
Amilase	AMY	C	Angiospermas, Milho
Aminopectidase	AMP	H, J, O, Q	Aveia, Ervilha, Feijão
Aspartato Aminotransferase	ASA	C, H	Angiospermas, Coníferas
Aspartato Transaminase	GOT	F, P	Citros, Repolho
Catalase	CAT	C, K, Q	Angiospermas, Milho, Soja
Desidrogenase Alcoólica	ADH	I, L, M, P	Alfafa, Citros, Tomate
Diaforase	DIA	B, C, D	Soja
Endopeptidase	ENP	C, D	Milho, Soja
Enolase	G2D	H	Coníferas
Enzima Málica	ME	B, D	Milho, Soja
Esterase	EST	F, O	Cevada, Tomate
Fosfatase Ácida	ACP	K, S, T	Arroz, Eucalipto, Tabaco
Fosfatase Alcalina	ALP	C	Angiospermas, Aveia
Fosfofrutoquinase	FDP	G	Coníferas
Fosfomanoisomerase	MPI	C, D	Soja
Fumarase	FUM	G	Coníferas
α -Galactosidase	α -GAL	G	Coníferas
β -Galactosidase	β -GAL	G	Coníferas
Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	G6P	G, H, K	Coníferas, Tabaco
β -Glucosidase	GLU	B, G	Coníferas, Milho
Glutamato Desidrogenase	GDH	C, H, Q	Coníferas, Milho
Isocitrato Desidrogenase	IDH	D, E	Milho, Soja, Tomate
Malato Desidrogenase	MDH	A, B, D, T	Eucalipto, Soja, Milho
Peroxidase	PER	C, J, N, R	Cevada, Petúnia, Pinheiro
Superóxido Dismutase	SOD	B, C, D	Milho, Soja

*Vide descrição dos tampões na tabela 13.

- A. Misture todos os componentes do gel, exceto o amido. Ajuste o pH.
- B. Decante um quarto da solução-tampão.
- C. Aqueça os 75% restantes do tampão em béquer, até a fervura.
- D. Misture os 25% não aquecidos com a quantidade total de amido a ser usada, em frasco de sucção. Espere até obter boa emulsão.
- E. Adicione, rapidamente, o tampão fervente ao frasco de sucção que contém a emulsão de amido.
- F. Aplique vácuo para remover excesso de gases. Continue a aquecer a solução até a fervura.
- G. Aplique os géis: o volume e a espessura dependem do aparato usado e número desejado de colorações.

TABELA 13. Exemplos de sistemas-tampões e respectivos códigos, para a eletroforese de isozimas de amostras vegetais (adaptado de Shields et al., 1983).

Código	Tampão do Eletrodo (TEI)	pH	Tampão do Gel	pH
A	L-histidina 0,05 M (7,75g.L ⁻¹); ácido cítrico 0,024 M (5,0 g.L ⁻¹); pH ajustado com ácido cítrico	5,0	L-histidina 0,004 M; ácido cítrico 0,002 M (= diluição 1:12 do TEI em água)	5,0
B	L-histidina 0,065 M (10,088g.L ⁻¹); ácido cítrico 0,02 M (4,125 g.L ⁻¹); pH ajustado com ácido cítrico	5,7	L-histidina 0,009 M; ácido cítrico 0,003 M (= diluição 1:6 do TEI em água)	5,7
C	Ácido bórico 0,19 M (11,875 g.L ⁻¹); hidróxido de lítio 0,04 M (1,6 g.L ⁻¹); pH ajustado com LiOH	8,3	Nove partes de Tris-ácido cítrico [Trizma base 0,05 M (6,2 g.L ⁻¹), ácido cítrico 0,07 M (1,5 g.L ⁻¹) pH 8,3] para uma parte do TEI	8,3
D	L-histidina 0,065 M (10,088 g.L ⁻¹); ácido cítrico 0,007 M (1,5 g.L ⁻¹); pH ajustado com ácido cítrico	6,5	L-histidina 0,016 M; ácido cítrico 0,002 M (= diluição 1:3 do TEI em água)	6,5
E	Ácido cítrico (9,04 g.L ⁻¹); Tris (16,35g.L ⁻¹)	7,0	Histidina (1,055 g.L ⁻¹); pH ajustado com NaOH	7,0
F	Borato de sódio 0,3 M	7,8	Ácido cítrico 3,6mM; Tris 1,52mM	7,8
G	Ácido cítrico 0,04 M (anidro)(7,684 g.L ⁻¹); pH ajustado com N-(3-aminopropil)-morfolina (10 mL)	6,1	Ácido cítrico 0,002 M (anidro) (= diluição 1:20 do TEI)	6,1
H	Ácido bórico 0,03 M; hidróxido de lítio 0,06 M	8,1	Ácido cítrico 0,005 M (anidro); Tris 0,03 M; adicionando-se o TEI a 1% (v/v)	8,5
I	Histidina 0,005 M	7,0	Citrato de sódio 0,41 M	7,0
J	Tris 0,02 M (3,0 g.L ⁻¹); glicina 0,19M (14,4 g.L ⁻¹)	8,7	Idêntico ao TEI	8,7
K	Tris-glicina	8,0	Tris-HCl	8,0
L	Ácido bórico 0,3 M; pH ajustado com NaOH	7,8	Tris 0,015 M; ácido cítrico 0,004 M	7,8
M	Tris 0,0375 M; ácido cítrico 0,025M	7,0	Tris 0,011 M; ácido cítrico 0,004 M	7,0
N	Ácido bórico 0,3 M; NaOH 0,031M	7,5	Tris 0,15 M; ác. cítrico 3mM anidro	7,7
O	Ácido bórico 0,30 M; NaOH 0,10 M	8,3	Tris 0,19 M; ác. cítrico 5mM anidro	7,9
P	Ácido bórico 0,34 M; pH ajustado com NaOH	8,7	Tris 0,02 M; pH ajustado com ácido cítrico anidro	7,7
Q	Ácido bórico 0,19 M; NaOH 0,14 M	8,3	Tris 46 mM; ácido cítrico 68 mM (anidro), LiOH 10 mM, ácido bórico 19 mM	8,3
R	Ácido bórico 0,65 M; Tris 0,5 M; Na ₂ EDTA 0,016 M	8,0	Tris 0,05 M; Na ₂ EDTA 0,0016 M; ácido bórico 0,05 M	8,5
S	Ácido bórico 0,30 M; NaOH 0,10 M	8,3	Ácido bórico 0,03 M; NaOH 5 mM	8,5
T	Citrato de Na 0,40 M; pH ajustado com ácido cítrico	8,0	DL-histidina 0,005 M	8,0

- H. Cubra os géis com uma placa de vidro, assim que a superfície do amido começar a se solidificar (cerca de 2 min). Esse passo visa propiciar espessura uniforme no gel.
- I. Deixe os géis esfriarem, em temperatura ambiente, de um dia para o outro. Os géis devem ser esfriados para 2-4°C imediatamente antes da eletroforese.

33.3.2. Extração

- A. Macere a amostra (100 mg, para folhas ou raízes) em 1 mL de tampão (consulte a tabela 14) a 2°C. Trabalhe com rapidez e processe poucas amostras de cada vez (de 10 a 20).
- B. Aplique o extrato diretamente, ou após clarificação em papel-filtro, em pedaços de papel de filtro com comprimento 2 mm maior que a espessura do gel (para agilizar a remoção) e largura de 3 mm. Essas dimensões podem ser alteradas, para maximizar a resolução e a eficiência.

33.3.3. Aplicação no Gel

- A. Apare o gel, após remoção das placas de vidro, e corte-o em fatias transversais, a 4 cm da extremidade catódica.
- B. Deixe espaço suficiente entre as amostras, para não confundir a visualização dos resultados. Um gel com 18 cm de largura pode receber 20-30 amostras.

33.3.4. Eletroforese

- A. Aplique um rápido pulso elétrico, para provocar o movimento das moléculas com carga, do extrato bruto nos pedaços de papel para a seção catódica (ou anódica) do gel.
- B. Use pulsos de 3,7 watts (150 V, 25 mA), por 15 min.
- C. Remova os pedaços de papel com pinças, para que as proteínas na origem não fiquem sendo eluídas continuamente. Remova resíduos com algodão.
- D. Reconecte, após remover os pedaços de papel, as seções catódica e anódica do gel, eliminando as bolhas de ar aprisionadas.
- E. Insira um espaçador na extremidade catódica ou anódica, para introduzir torção. Isso ajudará a prevenir a formação de espaço vazio no ponto de origem, caso haja retração do gel.
- F. Cubra o gel com material inerte (plástico), deixando 2 cm expostos, em cada extremidade.
- G. Coloque as extremidades do gel em contato com o reservatório do tampão, diretamente ou por meio de esponjas de celulose. Ligue a fonte de energia.
- H. Faça testes preliminares para estabelecer as condições ideais (especialmente a duração da corrida) para o sistema isozimático que estiver estudando.

OBSERVAÇÃO

- A migração é, geralmente, anódica.
- A 250 V, um gel de amido 12% (p/v) levemente alcalino requer, tipicamente, duração de corrida de 3-4 h. À medida que a corrida se desenvolve, a resistência do gel aumenta e o campo elétrico tem de ser ajustado. Fontes de energia constante fazem essa compensação automaticamente.

33.3.5. Fatiamento do Gel

- Uma das principais vantagens da eletroforese em amido sobre a PAGE é o menor custo e a possibilidade de uso de géis espessos e maleáveis. Após a separação de proteínas, os géis de amido podem ser cortados em fatias horizontais e corados, simultaneamente, para atividades isozimáticas independentes. Por exemplo: se um gel é subdividido em quatro e existem três *loci* polimórficos por enzima, fenótipos em até 12 *loci* podem ser determinados para cada uma das 20-30 amostras em uma única corrida.
- O fatiamento é feito com um arame fino de aço inoxidável, preso a pontos fixos e passado por entre o gel imobilizado. Existem aparatos próprios para se suspender o gel, após o corte, os quais também determinam a altura de cada fatiamento.
- O arame é passado vagarosamente através do gel e as fatias são cuidadosamente removidas e coladas em diferentes soluções corantes. Visto que as propriedades físicas de uma dada isozima podem causar migração diferente conforme a profundidade no gel, as diferentes fatias devem ser testadas para máxima resolução em cada sistema isozimático estudado.

33.4. Coloração de Sistemas Isozimáticos - Alguns Exemplos

- Neste item são descritos alguns métodos para a revelação de enzimas (adaptado de Vellejos, 1983) em géis de amido. A não ser que seja especificado de maneira diferente, a reação de coloração é paralisada descartando-se a solução do corante, seguindo-se 3-5 lavagens do gel com água destilada. Caso os géis tenham que ser fotografados, é recomendável uma lavagem adicional, por 15-30 min, em agitador orbital lento. Assim, as substâncias não-reativas irão se difundir para fora do gel, reduzindo a coloração de fundo e evidenciando as bandas.

Isozima	Solução Corante	Procedimento
Desidrogenase Alcoólica	Tris 0,1 M pH 7,5 (100 mL), NAD ⁺ (30 mg), MTT (20 mg), PMS (4 mg) e etanol absoluto (6mL) - adicionado imediatamente antes da incubação)	Faça a incubação no escuro a 30°C, por 15-60 min. descarte a solução, paralise a reação e faça a fixação.
Malato Desidrogenase	Tris 0,1 M pH 7,5 (100 mL), DL-malato 1 M pH 7,5 (3 mL), NAD ⁺ (30 mg), MTT (20 mg), PMS (4mg)	Faça a incubação no escuro a 30°C, por 15-60 min, ou até que as bandas apareçam. Pare a reação e faça a fixação. O malato deve ser preparado imediatamente antes do uso.
Nitrato Redutase	Solução A: fosfato de K 0,1 M pH 7,5 (100 mL), KNO ₃ (150mg), etanol 95% (v/v) (2,5mL), NADH (30 mg), ADH (100 UA) - adicione ao incubar; Solução B: Sufanilamida 1% (p/v) em HCl 1 N (50 mL), dicloreto de N-(1-naftil)-etilendiamina 0,01% (v/v) em tampão fosfato pH 7,5 (50mL)	Faça a incubação do gel na solução A a 30°C, por 30 min. Descarte a solução, lave o gel com água e coloque a solução B. Em poucos minutos, bandas róseas se desenvolverão.
PEP Carboxilase	Tricina 0,1 M pH 7,0 (100 mL), MgCl ₂ .6H ₂ O 1 M (1mL), PVPP (500 mg), PEP (120 mg), NaHCO ₃ (160 mg), <i>Fast Blue BB Salt</i> (100 mg)	Faça a incubação do gel no escuro a 30°C, por 15-30 min, descarte a solução, lave com água e faça a fixação.

33.5. Fixação e Preservação

- Géis de amido podem ser fixados em etanol 50% (v/v). Após alguns minutos, o gel começa a endurecer, perdendo a flexibilidade.
- O etanol pode solubilizar alguns precipitados. Por isso, uma alternativa é o uso de glicerol 50-100% (v/v), que torna o gel mais translúcido, favorecendo a densitometria e a fotografia.
- Para preparar o gel para densitometria, deve-se tratá-lo com glicerol quente (70°C), por alguns minutos. Para fotografia, deve-se deixar o gel em banho de glicerol 50% (v/v), por 12 h.
- Após a fixação, os géis devem ser acondicionados em filme de polietileno e armazenados a 5°C, por vários meses. Alternativamente, pode-se usar secadores de géis.

33.6. Referências Bibliográficas

- FARKAS, G.L.; STAHMANN, M.A. On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. **Phytopathology**, St. Paul, v.56, p.669-671, 1966.
- MARKERT, M.F.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, Washington, v.45, p.753-763, 1959.
- SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. eds. **Isozymes in plant genetics and breeding. Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.443-468.
- VELLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. eds. **Isozymes in plant genetics and breeding. Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.469-516.
- VARNER, J.E.; CHANDRA, G.R. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, Washington, v.52, p.100-106, 1964.

34. SÍNTESE DE AMIDO

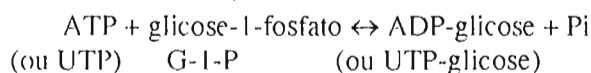
CUIDADOS

- Observe os mesmos cuidados descritos no capítulo 10.

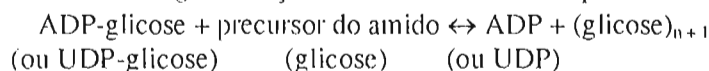
34.1. Introdução

Nas plantas, o amido é um importante composto químico de reserva, sendo empregado como fonte energética quando o suprimento externo é inadequado (ex. no escuro). O amido ocorre como grãos insolúveis em cloroplastos ou, no caso de raízes e tubérculos, em amiloplastos. Dada sua insolubilidade, o amido não contribui para o potencial osmótico da célula.

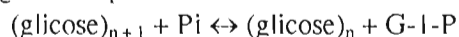
Conforme Preiss & Kosuge (1970), a síntese de amido requer a ativação de glicose, na forma de um derivativo de fosfato de nucleotídeo, a saber:



Em seqüência, uma *transglicolização* ocorre, conforme o esquema:



A degradação pode ocorrer via duas enzimas diferentes. A quebra hidrolítica produz resíduos de glicose e/ou maltose e é catalisada pela amilase. A quebra fosfolítica produz G-1-P e é catalisada pela fosforilase, conforme o seguinte esquema:



Essa reação é reversível ($\Delta G^{\circ} = + 0,73 \text{ kcal.mol}^{-1}$) mas, na célula, ela procede somente na direção da degradação, portanto mantendo mecanismos anabólicos e catabólicos separados.

Neste capítulo são descritas duas estratégias para se verificar o nível de amido em tecidos, com base no método $\text{I}_2\text{-KI}$ de Krisman (1962). Em uma delas, é demonstrada a ocorrência e distribuição de amido em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. A reação da fosforilase irá catalisar a síntese de amido nesse sistema de células livres (a degradação somente é catalisada em células intactas). Na outra, o amido é extraído de raízes de *Medicago sativa* L., por uma adaptação do método de Yeh et al. (1981), e fracionado por cromatografia (Fankhauser et al., 1989).

34.2. Localização dos Grânulos de Amido em Folhas de Feijoeiro

- Remova uma folha de um feijoeiro com três semanas de idade que tenha sido exposto à luz do sol por várias horas.
- Coloque a folha em água fervente, por 30 s.
- Coloque a folha em etanol 95% (v/v) e aqueça em banho de água fervente, até que a maioria dos pigmentos tenha sido extraída (aproximadamente, 20 min).
- Coloque a folha em água fervente, por 10 s, e a transfira para placa de *Petri* com solução $\text{I}_2\text{-KI}$ (5 g de I_2 e 10 g de KI em água, q.s.p. 100 mL).
- Observe as áreas que ficarem negras, as quais denotam as posições dos grânulos de amido - fotografe ou faça diagramas.
- Repita o experimento com uma folha de feijoeiro cultivado no escuro, por dois ou três dias.

OBSERVAÇÃO

- As folhas dos experimentos podem ser colocadas entre duas transparências, posicionadas em mesa de vidro com iluminação, transferidas para computador, por meio de *scanner*, e editadas. Como alternativa, elas podem ser fotografadas.

34.3. Conversão de Açúcares em Amido, em Folhas de Feijoeiro

- Coloque feijoeiros com três semanas de idade no escuro, por dois dias.
- Remova algumas folhas e mergulhe seus pecíolos em béqueres que contenham um dos seguintes tratamentos:
 - glicose 0,5 M
 - frutose 0,5 M
 - sacarose 0,5 M
 - água
- Mantenha esse material no escuro por dois dias.
- Faça a coloração de cada um dos tratamentos, como no item 34.2., e registre os resultados.

34.4. Extração e Ensaio da Atividade da Fosforilase

- Corte pequenos pedaços de uma batata (*Solanum tuberosum* L.) sem epiderme, até obter 10 g de amostra.
- Triture a amostra em cerca de 30 mL de solução NaF 10 mM (1 mg NaF.g⁻¹ amostra).
- Filtre o homogeneizado em funil de *Buchner* e centrifugue o filtrado a 27.000 x g (2°C), por 10 min. Use o sobrenadante como solução enzimática e conduza o ensaio descrito a seguir.
- Transfira as seguintes soluções para quatro tubos de ensaio:
 - 2 mL de glicose 0,2% (p/v) + 1 mL de água.
 - 2 mL de glicose 0,2% (p/v) + 1 mL KH₂PO₄ 0,21 M
 - 2 mL de G-1-P 0,25% (p/v) + 1 mL de água
 - 2 mL de G-1-P 0,25% (p/v) + 1 mL KH₂PO₄ 0,21 M
- Adicione 1 mL da solução enzimática a cada tubo e misture.
- Transfira, a cada 5 min, uma alíquota de 400 µL para uma lâmina de microscópio. Adicione 400 µL da solução I₂-KI sobre a amostra e observe o desenvolvimento da coloração. Conduza o experimento por 1 h.

34.5. Extração e Cromatografia em Raízes de Alfafa

- Coloque 100-500 mg de amostras de raízes em 20 mL de DMSO 90% (v/v), com agitação, por 24 h, para dispersar os grânulos de amido.
- Centrifugue a solução a 500 x g em temperatura ambiente, por 5 min, e colete o sobrenadante. Faça três extrações com DMSO, em seqüência, para poder recuperar mais de 95% do amido da raiz de alfafa.
- Adicione três volumes de etanol 95% (v/v) à amostra e deixe o amido extraído se precipitar a 4°C, por 12 h.
- Centrifugue o material a 12.000 x g em temperatura ambiente, por 5 min. Lave o sedimento com etanol 95% (v/v), para remoção dos resíduos de DMSO. Centrifugue de novo a amostra a 12.000 x g, por 5 min.

- E. Ressuspenda o amido em 3-4 mL de NaOH 0,01 N. Faça uma centrifugação final, a $500 \times g$ em temperatura ambiente, por 5 min, para remoção dos materiais insolúveis em NaOH. Determine a concentração de amido, como equivalente-glicose $\times 0,9$, usando o reagente de antrona (capítulo 10).
- F. Use, para as separações cromatográficas, colunas de 1,5 x 70 cm com *Sepharose*. Para as análises quantitativas de componentes do amido, aplique amostras com 1,5 mg de amido.
- G. Colete as frações a intervalos de 6 min, usando uma taxa de fluxo de $0,40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, tendo NaOH 0,01 N como eluente. Determine os teores de carboidratos de cada fração (capítulo 10).
- H. Compare os perfis de eluição dos componentes de PM alto e baixo com aqueles obtidos com amilose de batata e amilopectina de milho (disponíveis comercialmente).
- I. Faça as análises quantitativas do amido presente em cada fração pelo método I_2 -KI de Krisman (1962). Para essas análises, aplique 10 mg de amido na coluna e considere as frações tendo uma razão de absorvância 520 nm/615 nm maior que 1,0, como sendo, primariamente, amilopectina. Use os valores de concentração de carboidratos (passo G.) para calcular a razão PM baixo/PM alto.

34.6. Referências Bibliográficas

- FANKHAUSER Jr., J.J.; VOLENEC, J.J.; BROWN, G.A. Composition and structure of starch from taproots of contrasting genotypes of *Medicago sativa* L. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, p.1189-1194, 1989.
- KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.4, p.17-23, 1962.
- PREISS, J.; KOSUGE, T. Regulation of enzyme activity in photosynthetic systems. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.21, p.433-466, 1970.
- YEH, J.Y.; GARWOOD, D.L.; SHANNON, J.C. Characterization of starch from maize endosperm mutants. **Starch**, Weinheim, v.33, p.222-230, 1981.

35. HORMÔNIOS - ENSAIO E PURIFICAÇÃO

CUIDADOS

- Use luvas e proteção facial quando fizer manipulações sob UV.
- Faça ensaios preliminares na TLC, visando obter proficiência na borrifação, para que as placas tenham espessura similar.

35.1. Introdução

O crescimento e o desenvolvimento envolvem vários mecanismos dependentes de controle hormonal. Por isso, revisões abrangentes sobre o assunto podem ser encontradas, praticamente, em qualquer livro-texto de fisiologia vegetal. Além disso, reguladores do crescimento exógenos têm grande aplicação em técnicas fisiológicas, especialmente na cultura *in vitro*. Visto que outras estratégias, tais como indução de metabolismo secundário e transformação, dependem da manipulação *in vitro*, a importância dessa categoria de substâncias é, mais uma vez, evidenciada.

O efeito de hormônios pode ser prontamente demonstrado por meio de bioensaios (ex. Burg & Burg 1966, Bukovac & Nakagawa 1968, Cooper et al. 1968, Williams & Stahly 1969 e Wareing 1976). Em muitos casos, todavia, é extremamente difícil obter-se reprodutibilidade de dados em resposta à aplicação de reguladores do crescimento. O mesmo ocorre quando se tenta correlacionar níveis de hormônios endógenos com taxas de crescimento. A causa mais provável é o desconhecimento da natureza das moléculas receptoras de hormônios nos sítios ativos, assim como seu nível em um dado tecido e os fatores que influenciam essa interação. Por isso, estudos nesse campo têm atingido alto grau de sofisticação, com o uso de técnicas muito refinadas, tais como a RP-HPLC, a combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (GC/EM) e os radioimunoensaios. Essas estratégias envolvem aparelhos de custo muito elevado, requerem treinamento especializado e, predominantemente, o emprego de isótopos radioativos. No Brasil, poucos laboratórios têm infra-estrutura para esses tipos de estudos.

Para uma análise rápida do nível de hormônios em amostras vegetais, a TLC continua sendo uma opção atraente, por não envolver as limitações mencionadas no parágrafo anterior. Além disso, ela é aplicável a algumas espécies ainda não estudadas (ex. várias forrageiras tropicais). Neste capítulo, é descrita uma abordagem de purificação, derivada de vários relatos (ex. Berg & Bryon, 1974), dos promotores de crescimento GA e IAA e do inibidor ABA, com base na TLC em sílica gel tipo 60 F₂₅₄, que apresenta fluorescência sob UV, a 254 nm. Adicionalmente, como exemplos, são apresentadas técnicas radioisotópicas de alta precisão para a purificação de hormônios. Vale enfatizar que elas requerem certificação para uso de elementos marcados e que, no caso do ABA, o radioimunoensaio de extratos aquosos (ex. Else et al. 1995 e Pekic et al. 1995) é comparável ao método da GC/EM.

35.2. TLC

35.2.1. Preparo da Amostra

A. Triture 50-100 g de amostra em liquidificador com 200 mL de metanol 80% (v/v) a 4°C, por 2 min.

- B. Deixe o homogeneizado sobre gelo, por 1 h, agitando ocasionalmente. Filtre o homogeneizado em papel-filtro tipo Whatman N° 1.
- C. Force a evaporação do metanol em evaporador giratório, até obtenção de um volume de 8 mL, a 30°C. Filtre esse concentrado aquoso, para remoção da clorofila precipitada. Ajuste a fase aquosa para pH 8,0, usando solução aquosa saturada de NaHCO₃.
- D. Faça três lavagens com acetato de etila, em funil de separação, para remoção de pigmentos e interferentes.
- E. Ajuste o pH da fase aquosa para 2,5-3,0, com H₂SO₄ 1 N. Faça extração, três vezes, em funil de separação, com acetato de etila ou éster dietílico, para remoção de GA, ABA, IAA e citocininas.
- F. Force a evaporação do extrato até a secagem quase total. Ressuspenda o material em 1 mL de metanol.
- G. Faça purificação adicional em coluna com PVPP compactado, conduzindo a corrida contra a gravidade, em tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. Aplique as amostras hormonais dissolvidas em solução aquosa de K₂HPO₄ 0,1 M pH 6,0.
- H. Ajuste o pH das frações para 3,5 e faça extração com acetato de etila, com posterior evaporação forçada deste último. Alíquotas com o teor desconhecido de hormônios podem ser dissolvidas em pequenos volumes de metanol, para purificação pela TLC, ou outros métodos.

35.2.2. Detecção de Padrões por meio de Cromatografia em Papel

- A. Aplique padrões de ABA, GA e IAA, como linhas individuais com 1 cm de comprimento, espaçadas em 1 cm, em uma das metades do papel.
- B. Adicione 50 µL de cada amostra (1 mg.mL⁻¹) ao lado de cada padrão, como uma linha.
- C. Faça a cromatografia no solvente clorofórmio-acetato de etila-ácido fórmico concentrado (60:40:5, v/v/v), em recipiente apropriado. Evite que o papel seja exposto à luz.
- D. Seque o papel, após 2 h, e observe sob luz UV de 254 nm. Calcule os valores de R_f para cada hormônio.
- E. Faça a detecção de GA, borrifando o papel com etanol-ácido sulfúrico 95:5 (v/v) e aquecendo-o por 5 s. Enquanto o papel estiver sendo exposto, prepare placas de 300-500 µ, conforme descrito a seguir. Elas são usadas para separar quantidades maiores de hormônios.

35.2.3. Preparo da Placa de TLC

- A. Faça a limpeza de placas de vidro de 20 x 20 cm, ou 10 x 20 cm. Embora as placas possam ter qualquer tamanho, é necessário que elas se encaixem no aparato borrifador.
- B. Misture o absorvente da seguinte forma:
 - a) Misture, para placas de sílica-gel, 30 g do gel com 68 mL de água destilada. Pode ser necessário adicionar mais água, para se obter a mistura ideal. Se a mistura estiver muito espessa, o absorvente irá se espalhar de forma desigual. Se ela estiver muito fluida, o absorvente irá passar direto pela calha. Para a sílica gel com um ligante de gesso (gipsita), é necessário usar uma mistura mais fluida. Caso contrário, quando cinco ou seis placas tiverem sido espalhadas nas placas de vidro, a mistura começará a ficar espessa, tornando a borrifação difícil.
 - b) Misture, para placas de celulose sem ligante, 15 g do pó de celulose e cerca de 90 mL de água destilada. Homogeneíze o material em liquidificador, até que as fibras sejam rompidas. Observe se a consistência está cremosa e homogênea. Se a mistura não estiver bem feita, as placas exibirão pequenas fibras na presença do absorvente. Muito embora a mistura pareça espessa e difícil de espalhar ao ser removida do liquidificador, evite adicionar água em excesso, pois a placa ficará muito fina e passará direto pela calha. Quando empregar ligante de gipsita

(sulfato de cálcio hidratado, gesso natural), adicione um pouco mais de água, pois o ligante tende a fazer com que o absorvente fique espesso mais rapidamente.

C. Espalhe o material, para fazer as placas, da seguinte forma:

a) Método da Placa Móvel:

a₁) Coloque uma placa de vidro sob a calha do aparato para borrifação.

a₂) Encaixe os dois fechadores. O fechador do lado em que a placa será removida deve ser posicionado para uma camada com espessura de 300 µ. A espessura da placa de TLC depende da concentração da amostra que será aplicada e da natureza da substância que se quer separar.

a₃) Aplique a mistura água-absorvente. Empurre a placa através da calha, usando outra placa de vidro, até que esta apareça na extremidade final. Atue de maneira constante e firme, para não provocar estrias no absorvente.

b) Método da Calha Móvel

b₁) Coloque, rapidamente, 5-6 placas de vidro, de ponta a ponta, no aparato de preparação.

b₂) Coloque a calha em uma extremidade do aparato e aplique nela o absorvente.

b₃) Passe então a calha por sobre as placas, espalhando o absorvente no processo.

D. Coloque as placas em um forno a 110°C, por 30-60 min. Esse passo ativa as placas, por meio da remoção de partículas de água ligadas à sílica gel e permite que compostos do processo de separação interajam com a sílica gel.

E. Remova as placas do forno e deixe esfriar em temperatura ambiente.

F. Procure reproduzir, para cada placa, o tempo gasto entre o resfriamento e a revelação das manchas, porque as placas de TLC começarão a absorver umidade, após a remoção. Dessa forma, os valores de R_f poderão ser reproduzidos.

35.2.4. Solventes

clorofórmio-acetato de etila-ácido acético	60:40:5 (v/v/v)
acetato de metila-2-propanol-amônia 25%	45:35:2 (v/v/v)
tolueno-acetato de etila-ácido acético	40:5:2 (v/v/v)
isopropanol-amônia concentrada-água	8:1:1 (v/v/v)

35.2.5. Visualização

ABA:	Mancha escura dissipante, sob iluminação UV.
GA:	Após borrifar a placa com mistura etanol-ácido sulfúrico (95:5, v/v), aqueça-a por 2-5 min. A GA se revela como manchas verde-azuladas fluorescentes, sob iluminação UV.
IAA:	Região dissipante, sob iluminação UV e fundo exibindo fluorescência pelo F ₂₅₄ .

- Após analisadas, as placas devem ser colocadas para secar, até que os solventes se evaporem.

35.2.6. Aplicação de Hormônios à Placa de TLC

A. Aplique uma alíquota da amostra (ex. 100 µg) sobre a placa de sílica gel (espessura de 300-500µ), preparada sem ligante ou gipsita, na forma de um risco de 2 cm de comprimento.

B. Aplique os padrões hormonais, fazendo riscos de 1 cm de comprimento.

- C. Cubra essas aplicações com lâmina de alumínio, para poder eluir os hormônios endógenos, e faça a borrifação nos sítios dos padrões com as misturas apropriadas, expondo-os, a seguir, à radiação UV. **Marque a região da placa onde estes padrões estão localizados.**
- D. Raspe cada região da sílica gel onde as amostras foram aplicadas e cobertas com lâmina de alumínio, e as coloque, individualmente, em recipientes de pesagem. Transfira cada uma para tubos de ensaio.
- E. Faça a eluição dos hormônios presentes nessas amostras, usando água saturada com acetato de etila. Faça a eluição duas vezes.
- F. Remova o acetato de etila (o qual contém os hormônios) da sílica gel, por meio de centrifugação ou filtração (faça testes preliminares para determinar as condições ideais). Anote os volumes obtidos e preserve as soluções para condução de bioensaio.
- G. Repita o procedimento em uma região da sílica gel que não contém qualquer aplicação de hormônio. Esse extrato servirá de branco para os ensaios.
- H. Faça, como alternativa, a borrifação da placa com reagente etanol-ácido sulfúrico, aqueça a 100°C, por 2 min e examine sob radiação UV, caso a finalidade do estudo seja somente a determinação dos valores de R_f . Meça as distâncias a partir da origem e verifique a coloração das regiões que contêm os hormônios.

35.3. Bioensaios

35.3.1. Bioensaio para ABA Utilizando Trigo

- A. Mergulhe sementes de trigo em solução hipoclorito de sódio 10% (v/v) (lembre-se de que o produto comercial contém 2% do princípio ativo), por 15 min. Remova o hipoclorito de sódio, fazendo cinco lavagens com água destilada.
- B. Transfira alíquotas (anote o volume e a concentração) das frações hormônios-acetato de etila eluídas para placas de *Petri* que contêm um pedaço de papel-filtro tipo Whatman N°1 embebido em acetato de etila (após evaporação do excesso, na capela para exaustão de gases). Caso hormônios não tenham sido eluídos na TLC, use alíquotas de soluções-estoque de hormônio do laboratório. Adicione hormônios em quantidade suficiente para ter 20-100 µg em cada placa de *Petri*. Faça cinco repetições. Inclua duas testemunhas: uma é o tratamento sem ABA e a outra o papel-filtro embebido em água, em vez de acetato de etila.
- C. Adicione 8 mL de água destilada a cada placa de *Petri*, colocando, a seguir, 10 sementes esterilizadas. Mantenha o material no escuro, por 3-4 dias.
- D. Determine a taxa de germinação e meça o comprimento do coleóptilo e da radícula (mm).
- E. Compare as sementes tratadas com a testemunha.

35.3.2. Bioensaio para Giberelina com o Uso de Ervilha

- A. Plante as sementes em vermiculita (preferencialmente, após embeber em água) e cultive as plântulas por 8-10 dias, a 21°/16°C dia/noite. Inicie o bioensaio quando a folha do terceiro nó estiver com metade da expansão.
- B. Faça a raspagem da região da placa de TLC, onde se acredita que a GA esteja, e transfira o material coletado para um tubo de ensaio. Adicione 3 mL de acetato de etila, agite, e faça a filtração em papel tipo Whatman N°1, para outro tubo.
- C. Lave o tubo de ensaio original mais duas vezes, cada qual com 3 mL de acetato de etila, fazendo a filtração. Opcionalmente, os passos B. e C. podem ser substituídos pelo uso direto da amostra (desconhecido).
- D. Evapore o acetato de etila, ou o solvente usado no desconhecido, até secagem total, a 40°C.

- E. Ressuspenda a amostra que contém o GA desconhecido em 1 mL de água ou tampão fosfato 0,1 M pH 6,0, contendo 200 µL de *Tween 20*. Esse volume pode ser ajustado para se ter 1 mg amostra.mL⁻¹.
- F. Injete o volume entre as folhas apicais das plântulas, anotando a altura de cada uma. Tente fazer quatro repetições. Inclua dois tratamentos com aplicação de concentrações conhecidas de GA (produto disponível comercialmente). Inclua também uma plântula sendo injetada somente com a mistura água-*Tween 20*, para servir de testemunha.
- G. Coloque as plântulas em câmara de crescimento. Faça nova aplicação após quatro dias.
- H. Meça a altura da plântula e a altura do entrenó e compare com a testemunha e com as parcelas tratadas com níveis conhecidos de GA. Os dados podem ser expressados como porcentagem da testemunha, desde que o valor absoluto desta seja incluído. Faça o gráfico, comparando os tratamentos.

35.3.3. Bioensaio para IAA com o Uso de Trigo

- A. Mergulhe sementes de trigo em água destilada com aeração, por 2 h. Plante o material em vermiculita e faça o cultivo no escuro, a 25°C, por três dias.
- B. Seccione os 12 mm apicais do coleóptilo e coloque o segmento em água destilada, por 30 min, para remoção dos hormônios endógenos. Faça estas manipulações sob luz vermelha difusa.
- C. Coloque uma alíquota de solução com IAA em tubo de ensaio e evapore o solvente (geralmente, metanol), mantendo os tubos em dessecador. Use várias concentrações de IAA.
- D. Adicione 400 µL de tampão fosfato-citrato a cada tubo. Faça quatro repetições. Inclua quatro tubos sem IAA, como testemunha.
- E. Prepare o tampão fosfato-citrato da seguinte forma: misture 1,74 g de K₂ HPO₄ e 1,019 g de ácido cítrico em 1L H₂O com sacarose a 2% (p/v). Ajuste o pH para 5,0.
- F. Coloque quatro segmentos de coleóptilo em cada tubo de ensaio. Mantenha os tubos no escuro, sob rotação lenta a 25°C, por 20 h. Em seguida, remova os segmentos e meça o comprimento. Faça as comparações pertinentes.

35.4. Determinação de Giberelinas por RP-HPLC

- A seguinte técnica é preconizada por Toyomasu et al. (1992), em *Lactuca sativa* L.:
- A. Compare dois tratamentos: plantas germinadas e mantidas no escuro, por 10 dias, e o mesmo por nove dias + um dia sob luz branca contínua (5 W.m⁻²). Mantenha a temperatura a 25°C.
 - B. Colete o hipocótilo e faça a homogeneização e extração, três vezes, em metanol (2 L). Concentre cada extrato a vácuo, e dilua a resultante solução aquosa com água, até o volume de 500 mL. Ajuste o pH para 3,00, com HCl 6 M.
 - C. Faça a extração, três vezes, com acetato de etila (200 mL). Combine os extratos e faça nova extração, três vezes, com tampão fosfato 0,5 M pH 8,3 (200 mL). Ajuste o pH para 3,00, como anteriormente. Faça, novamente, a extração em três vezes, com acetato de etila (200 mL).
 - D. Combine os extratos e seque-os sobre recipiente com sulfato de sódio anidro, para obtenção de uma fração acídica de acetato de etila.
 - E. Dissolva, em ação paralela, o acetato de etila em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0. Transfira a solução para uma coluna (15 mm d.i. x 300 mm) de PVPP (1 g).
 - F. Faça a eluição com o mesmo tampão (30 mL). Ajuste o pH das frações para pH 3,00 e submetas-os, por três vezes, à extração com acetato de etila (10 mL). Combine os extratos e seque-os sobre recipiente com sulfato de sódio anidro e, em seguida, use vácuo para forçar a evaporação.

- G. Purifique o extrato de acetato de etila em cartucho tipo Sep-Pak e Sepralyte (0,5 g) e submeta-o à RP-HPLC, conforme o método de Endo et al. (1989), em uma coluna tipo Senshu-Pak, de 10 mm d.i. x 250 mm, para a obtenção de 32 frações.
- H. Conduza o ensaio para GA pelo método de Nishijima & Katsura (1989), usando alíquotas correspondentes a 2,0 g MV.
- I. Faça a metilação de cada amostra a ser submetida à GC/EM, com *diazometane* etéreo e, subsequentemente, trimetilação com MSTFA a 80°C, por 30 min.
- J. Empregue um sistema GC/EM, equipado com coluna de capilaridade de sílica fundida e quimicamente ligada, para as análises (vide Endo et al., 1989).

35.5. Purificação de Giberelinas por RP-HPLC com o Uso de Padrões Marcados com ^2H

- A seguinte abordagem foi empregada por Olsen et al. (1995), em *Salix pentandra*:
 - A. Homogeneíze as amostras (meia folha ou metade do caule) em N_2 líquido e faça a extração em 100 mL de metanol 80% (v/v) aquoso a 4°C, por 16 h.
 - B. Adicione os seguintes padrões internos: (17,17- ^2H)-GA₁₉, (17,17- ^2H)-GA₂₀, (17,17- ^2H)-GA₁, (17,17- ^2H)-GA₈, (17,17- ^2H)-GA₂₀.
 - C. Purifique as amostras por partição contra acetato de etila, com uso de colunas de troca aniônica tipo QAE-Sephadex A25, seguido de RP-HPLC.

35.6. Purificação Conjunta de AIA e ABA por GC/EM com o Uso de ^2H e ^{13}C

- O seguinte método foi descrito por Pearce & Taylor (1995), em *Elytrigia repens* (L.) Beauv., visando à purificação em pequena escala, a partir de amostras de 10 gemas, variando de 0,22 a 5,34 mg no peso total:
 - A. Triture a amostra liofilizada em um minifrasco e faça a extração em 100 μL de mistura metanol-água 4:1 (v/v). Adicione os padrões internos ($^{13}\text{C}_6$)IAA (200 μg) e ($^2\text{H}_6$)ABA (500 μg) a cada amostra.
 - B. Centrifugue a amostra a 500 x g, por 5 min, para sedimentar os resíduos. Transfira o sobrenadante para outro minifrasco e faça nova extração no sedimento, em 100 μL de metanol, centrifugando-o, após, a 500 x g, por 5 min. Combine o sobrenadante com o extrato e elimine a fase alcoólica com N_2 (o volume final será menor que 10 μL).
 - C. Adicione 100 μL de uma mistura aquosa acidificada (ácido acético-água 1:99, v/v) e remova os compostos de menor polaridade 1,1 mL de n-hexano. Repita essa partição três vezes, para remover interferentes do metil éster na análise de ABA pela GC/EM.
 - D. Fracione a fase aquosa três vezes, contra volumes de 100 μL de CH_2Cl_2 , combinando os volumes e fazendo a evaporação com N_2 . Dissolva o resíduo obtido em 10 L de metanol e faça a metilação com *diazometane* recém-preparado.
 - E. Dissolva a amostra metilada em n-hexano e injete uma alíquota, a frio, em coluna de capilaridade tipo DB1701-15N (15 m, 0,25 mm d.i.; filme de 0,25 μm de cianopropil 5% p/p, metilsilicone 95% p/p), conectada a um detector seletivo de massa. Para o programa de GC usado (20°C.min⁻¹ a 165°C, e então 5°C.min⁻¹ a 225°C), o éster metílico do IAA é eluído em 12 min e o éster metílico do ABA em 16 min.
 - F. Faça a detecção e medição dos compostos endógenos e os padrões internos correspondentes, marcados com radioisótopos, por monitorização iônica selecionada (150 ms para o IAA e 100 ms para o ABA).

35.7. Referências Bibliográficas

- BERG, L.H.; BRYON, H.H. Determining endogenous gibberellins in tall and dwarf tomatoes by a new tomato bioassay and chromatography. In: SUMIKI, Y. ed. **Plant growth substances 1973**. Tokyo: Hirokawa, 1974. p.52-63.
- BUKOVAC, M.J.; NAKAGAWA, S. Gibberellin-induced asymmetric growth of apple fruits. **HortScience**, Alexandria, v.3, p.172-174, 1968.
- BURG, S.P.; BURG, E.A. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, Washington, v.55, p.262-269, 1966.
- COOPER, W.C.; RASMUSSEN, G.K.; HUTCHINSON, D.J.; ROGERS, B.J.; REECE, D.C.; HENRY, W.H. Control of abscission in agricultural crops and its physiological basis. **Plant Physiology**, Rockville, v.43, p.1560-1576, 1968.
- ELSE, M.A.; HALL, K.C.; ARNOLD, G.M.; DAVIES, W.J.; JACKSON, M.B. Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants. Accounting for effects of xylem sap flow rate on concentration and delivery. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.377-384, 1995.
- ENDO, K.; YAMANE, H.; NAKAYAMA, M.; YAMAGUSHI, I.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N.; KATSUMI, M. Endogenous gibberellins in the vegetative shoots of tall and dwarf cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.30, p.137-142, 1989.
- NISHIJIMA, T.; KATSURA, N. A modified micro-drop bioassay using dwarf rice for detection of femtomol quantities of gibberellins. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.30, p.623-627, 1989.
- OLSEN, J.E.; JENSEN, E.; JUNTILLA, O.; MORITZ, T. Photoperiodic control of endogenous gibberellins in seedlings of *Salix pentandra*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, p.639-644, 1995.
- PEARCE, D.W.; TAYLOR, J.S.; ROBERTSON, J.M.; HARKER, K.N.; DALY, E.J. Changes in abscisic acid and indole-3-acetic acid in axillary buds of *Elytrigia repens* released from apical dominance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.94, p.110-116, 1995.
- PEKIC, S.; STIKIC, R.; TOMLIJANOVIC, L.; ANDJELKOVIC, V.; IVANOVIC, M.; QUARRIE, S.A. Characterization of maize lines differing in leaf abscisic acid content in the field. I. Abscisic acid physiology. **Annals of Botany**, London, v.75, p.67-73, 1995.
- TOYOMASU, T.; YAMANE, H.; YAMAGUCHI, I.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N.; INOUE, Y. Control by light of hypocotyl elongation and levels of endogenous gibberellins in seedlings of *Lactuca sativa* L. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.33, p.695-701, 1992.

WAREING, P.F. Modification of plant growth by hormones and other growth regulators. **Outlook on Agriculture**, Elmsford, v.9, p.42-45, 1976.

WILLIAMS, M.W.; STAHLY, E.A. Effect of cytokinins and gibberellins on shape of 'Delicious' apple fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount, v.94, p.17-19, 1969.

APÊNDICE A

FATORES PARA CONVERSÃO DE UNIDADES

Medida	Para converter da Coluna 1 para a Coluna 2, multiplique por	Coluna 1 SI	Coluna 2 não SI	Para converter da Coluna 2 para a Coluna 1, multiplique por
Ângulo	57,3	rad	graus, °	$1,75 \times 10^{-2}$
Área	2,47	ha	acre	0,4405
	247	km^2	acre	$4,05 \times 10^{-3}$
	0,386	km^2	mi^2	2,59
	$2,47 \times 10^{-4}$	m^2	acre	$4,05 \times 10^3$
	10,76	m^2	ft^2	$9,29 \times 10^{-2}$
	1,2	m^2	yd^2	0,8
	0,155	cm^2	in^2	6,45
	$1,55 \times 10^{-3}$	mm^2	in^2	645
Comprimento	0,621	km	mi	1,609
	1,094	m	yd	0,914
	3,28	m	ft	0,304
	1,0	μm	μ	1,0
	$3,94 \times 10^{-2}$	mm	in	25,4
	10	nm	Å	0,1
Concentrações	1,0	cmol.kg^{-1}	meq.100g^{-1}	1,0
	0,1	g.kg^{-1}	%	10
	1,0	mg.kg^{-1}	ppm	1,0
Condutividade Elétrica e Magnetismo	10	S.m^{-1}	mmho.cm^{-1}	0,1
	10^4	T	G	10^{-4}
Energia, Trabalho	$9,52 \times 10^{-4}$	J	Btu	$1,05 \times 10^3$
	0,239	J	cal	4,19
	10^7	J	erg	10^{-7}
	0,735	J	ft-in	1,36
	$2,387 \times 10^{-5}$	J.m^2	cal.cm^{-2}	$4,19 \times 10^4$
	10^5	N	dyne, dina	10^{-5}
	$1,43 \times 10^{-3}$	W.m^{-2}	$\text{cal.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$	698
Massa	$2,20 \times 10^{-3}$	g	lb	454
	$3,52 \times 10^{-2}$	g	oz	28,4
	2,205	kg	q	100
	$1,10 \times 10^{-3}$	kg	ton	907
	1,102	t	ton	0,907

FATORES PARA CONVERSÃO DE UNIDADES - continuação.

Medida	Para converter da Coluna 1 para a Coluna 2, multiplique por	Coluna 1 SI	Coluna 2 não SI	Para converter da Coluna 2 para a Coluna 1, multiplique por
Medidas Hídricas	$9,73 \times 10^{-3}$	m^3	acre-in	102,8
	$9,81 \times 10^{-3}$	$m^3.h^{-1}$	$ft^3.s^{-1}$	101,9
	4,40	$m^3.h^{-1}$	gal.min ⁻¹	0,227
	8,11	ha-m	acre-ft	0,123
	97,28	ha-m	acre-in	$1,03 \times 10^{-2}$
	$8,1 \times 10^{-2}$	ha-cm	acre-ft	12,33
Nutrientes de Plantas	2,29	P	P ₂ O ₅	0,437
	1,20	K	K ₂ O	0,830
	1,39	Ca	CaO	0,715
	1,66	Mg	MgO	0,602
Pressão	9,90	MPa	atm	0,101
	10	MPa	bar	0,10
	1,00	$t.m^{-3}$ ou $Mg.m^{-3}$	$g.cm^{-3}$	1,00
	$2,09 \times 10^{-2}$	Pa	lb.ft ⁻²	47,90
	$1,45 \times 10^{-4}$	Pa	lb.in ⁻²	$6,90 \times 10^3$
Produtividade	0,893	$kg.ha^{-1}$	lb.acre ⁻¹	1,12
	$7,77 \times 10^{-2}$	$kg.m^{-3}$	lb.bu ⁻¹	12,87
	$1,49 \times 10^{-2}$	$kg.ha^{-1}$	bu.acre ⁻¹ , 60 lb	67,19
	$1,59 \times 10^{-2}$	$kg.ha^{-1}$	bu.acre ⁻¹ , 56 lb	62,71
	$1,86 \times 10^{-2}$	$kg.ha^{-1}$	bu.acre ⁻¹ , 48 lb	53,75
	0,107	L.ha ⁻¹	gal.acre ⁻¹	9,35
	893	$t.ha^{-1}$ ou $Mg.ha^{-1}$	lb.acre ⁻¹	$1,12 \times 10^{-3}$
	0,446	$t.ha^{-1}$ ou $Mg.ha^{-1}$	ton.acre ⁻¹	2,24
Radioatividade	$2,7 \times 10^{-11}$	Bq	Ci	$3,7 \times 10^{10}$
	$2,7 \times 10^{-2}$	Bq.kg ⁻¹	pCi.g ⁻¹	37
	100	Gy	rd	0,01
	100	Sv	rem	0,01
Superfície Específica	10	$m^2.kg^{-1}$	$cm^2.g^{-1}$	0,1
	1.000	$m^2.kg^{-1}$	$mm^2.g^{-1}$	0,001
Temperatura	$(9/5 \text{ } ^\circ C) + 32$	$^\circ C$	$^\circ F$	$5/9(^\circ F - 32)$
	$(K - 273)$	K	$^\circ C$	$(^\circ C + 273)$

FATORES PARA CONVERSÃO DE UNIDADES - continuação.

Medida	Para converter da Coluna 1 para a Coluna 2, multiplique por	Coluna 1 SI	Coluna 2 não SI	Para converter da Coluna 2 para a Coluna 1, multiplique por
Transpiração e Fotossíntese	3,60 x 10 ⁻²	mg.m ⁻² .s ⁻¹	g.dm ⁻² .h ⁻¹	27,8
	5,56 x 10 ⁻³	mgH ₂ O.m ⁻² .s ⁻¹	μmolH ₂ O.cm ⁻² .s ⁻¹	10 ⁴
	10 ⁻⁴	mg.m ⁻² .s ⁻¹	mg.cm ⁻² .s ⁻¹	10 ⁻⁴
	35,97	mg.m ⁻² .s ⁻¹	mg.dm ⁻² .h ⁻¹	2,78 x 10 ⁻²
Velocidade	2,24	m.s ⁻¹	mi.h ⁻¹ (mph)	0,447
Volume	9,73 x 10 ⁻³	m ³	acre-in	102,8
	35,30	m ³	ft ³	2,83 x 10 ⁻²
	1,3	m ³	yd ³	0,76
	6,10	m ³	in ³	1,64 x 10 ⁻⁵
	2,84 x 10 ⁻²	L	bu	35,24
	1,057	L	qt	0,946
	3,53 x 10 ⁻²	L	ft ³	28,3
	0,265	L	gal	3,78
	33,78	L	oz (líquida)	2,96 x 10 ⁻²
	2,11	L	pt (líquido)	0,473
	0,067	mL	tbsp	15
0,2	mL	tsp	5	

APÊNDICE B

TÓPICOS METODOLÓGICOS COMPLEMENTARES

Assunto	Referências Bibliográficas
Amostragem de Raízes	<p>BARRERA, I.; GOMES GUTIÉRREZ, L.M. Aportación a la mejora de métodos de lavado de raíces. Anales de Edafología y Agrobiología, Madrid, v.44, p.275-280, 1985.</p> <p>PHILLIPS, D.R.; GAYNOR, J.D. A technique for in situ removal of subterranean plant materials grown under field conditions in clay-tile microplots. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v.65, p.807-809, 1985.</p>
Análise do Crescimento	<p>ARKEBAUER, T.J.; NORMAN, J.M. A pinpunch apparatus for quantifying the growth rate distribution in monocot leaves. Agronomy Journal, Madison, v.81, p.544-547, 1989.</p> <p>CAUSTON, D.R. Plant growth analysis: a note on the variability of unit leaf rate (net assimilation rate) within a sample. Annals of Botany, London, v.74, p.513-518, 1994.</p> <p>FERNANDEZ, S.R.; WAGNER, E. A new method of measurement and analysis of the stem extension growth rate to demonstrate complete synchronisation of <i>Chenopodium rubrum</i> plants by environmental conditions. Journal of Plant Physiology, Stuttgart, v.144, p.362-369, 1994.</p> <p>FRENSCH, J.; HSIAO, T. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. Plant Physiology, Rockville, v.104, p.247-254, 1994.</p> <p>SCHNYDER, H.; NELSON, C.J.; COUTIS, J.H. Assessment of spatial distribution of growth in the elongation zone of grass leaf blades. Plant Physiology, Rockville, v.85, p.290-293, 1987.</p>
Anticorpos Monoclonais	<p>McCULLOUGH, K.C.; SPIER, E. Monoclonal antibodies in biology and biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 387 p.</p>
Balanço Hídrico do Solo	<p>CLARK, L.J.; BIGGS, E.N. Comparison of irrigated scheduling on wheat. Neutron probe and computer model. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, I., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p. 73-75.</p>

Assunto	Referências Bibliográficas
Balanço Hídrico do Solo	<p>KLENKE, J.M.; FLINT, A.L.; NICHOLSON, R.A. A collimated neutron probe for soil-moisture measurements. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, I., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.21-28.</p> <p>SAVAGE, M.J.; RITCHIE, J.T.; KHUVUTLU, I.N. Soil hygrometers for obtaining water potential. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, I., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.119-124.</p> <p>TOPP, G.C. The application of time-domain reflectometry (TDR) to soil water content measurement. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, I., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.85-94.</p> <p>WIERENGA, P.J.; FOWLER, J.L.; DAVIS, D.D. Use of tensiometers for scheduling drip-irrigated cotton. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEASUREMENT OF SOIL AND PLANT WATER STATUS, I., 1987, Logan. Logan: Utah State University, 1987. p.157-162.</p>
Biocomputação	<p>SMITH, D.W. Biocomputing: informatics and genome projects. New York: Academic Press, 1994. 336 p.</p>
Biologia Molecular	<p>BERGER, S.L.; KIMMEL, A.R. Guide to molecular cloning techniques: methods in enzymology, v.152. San Diego: Academic Press, 1987. 812 p.</p> <p>DAVIS, L.G.; KUEHL, W.M.; BATTEY, J.F. Basic methods in molecular biology. Norwalk: Appleton & Lange, 1994. 792p</p> <p>KARAM, R.H.; J.D.; WARR, G.W. Methods in nucleic acids research. Boca Raton: CRC Press, 1991. 403 p.</p> <p>SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: CSH Press, 1989. 1.626 p.</p> <p>SINGER, M.; BERG, P. Genes & genomes. A changing perspective. Mill Valley: University Science Books, 1991. 929p.</p> <p>SYMONS, R.H. Nucleic acid probes. Boca Raton: CRC Press, 1989. 211 p.</p>

Assunto	Referências Bibliográficas
Biologia Molecular	WALKER, J.M. Basic protein and peptide protocols. Methods in molecular biology, v.32. Totowa: The Human Press, 1994. 512 p.
Bioquímica Vegetal	LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. Plant biochemistry and molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1993. 312 p.
Biossensores	CASS, A.E.G. Biosensors: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1990. 271 p.
	SCHEPER, T.; PLÖTZ, F.; MULLER, C.; HITZMANN, B. Sensors as components of integrated analytical systems. Trends in Biotechnology , Cambridge, v.12, p.42-46, 1994.
	BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H.H. Handbook of immunoblotting of proteins, v.2. Experimental and clinical applications. Boca Raton: CRC Press, 1988b. 214 p.
Câmara de Crescimento	DIESBURG, K.L.; CHRISTIANS, N.E.; GLADON, R.J. A continuous air-exchange roomette and gas-metering system. Crop Science , Madison, v.29, p.344-348, 1989.
Carboxissomos	ORÚS, M.I.; RODRÍGUES, M.L.; MARTÍNEZ, F.; MARCO, E. Biogenesis and ultrastructure of carboxysomes from wild type and mutants of <i>Synechococcus</i> sp. strain PCC 7942. Plant Physiology , Rockville, v.107, p.1159-1166, 1995.
Casa de Vegetação	CHAMONT, S.; STRAINCHAMPS, C.; THUNOT, S. Short- and long-term stomatal responses to fluctuations in environment in Southern European greenhouses. Annals of Botany , London, v.75, p.39-47, 1995.
	JANES, H. Environmental control in greenhouse management. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. eds. Biotechnologia para produção vegetal. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p.113-144.
	ROBITAILLE, H.A.; SCHON, M. Nutrition of greenhouse vegetables: an integrated crop management approach. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. Conferências... Lavras: SBFV, 1995. p.18-34.
Composição da Luz	ROBIN, C.; HAY, M.J.M.; NEWTON, P.C.D.; GREER, D.H. Effect of light quality (red:far-red ratio) at the apical bud of the main stolon on morphogenesis of <i>Trifolium repens</i> L. Annals of Botany , London, v.74, p.119-123, 1994.

Assunto	Referências Bibliográficas
Criopreservação	TESSEREAU, H.; FLORIN, B.; MESCHINE, M.C.; THIERRY, C.; PÉTIARD, V. Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. <i>Annals of Botany</i> , London, v.74, p.547-555, 1994. TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. <i>Annals of Botany</i> , London, v.74, p.541-546, 1994.
Cultura de Tecidos	DIXON, R.A. Plant cell culture: a practical approach . Oxford: IRL Press, 1985. 236 p. THORPE, T.A. Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture . New York: Academic Press, 1981. 379 p. TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas . Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. 433 p.
Densitometria	SCHOEFF, L.E.; WILLIAMS, R.H. Principles of laboratory instruments . St. Louis: Mosby Year-Book, 1993. 473 p.
Eletroforese de Capilaridade	LI, S.F.Y. Capillary electrophoresis: principle, practice and applications . Amsterdam: Elsevier, 1992. 586 p. TOUCHSTONE, J.C. Practice of thin layer chromatography . 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1992. 377 p.
Estatística Experimental	FINNEY, D.J. Was this in your statistics textbook? II. Data handling. <i>Experimental Agriculture</i> , Cambridge, v.24, p.343-353, 1988. FREUND, R.J.; WILSON, W.J. Statistical methods . Boston: Academic Press, 1993. 644 p. FRY, J.C. Biological data analysis: a practical approach . Oxford: Oxford University Press, 1993. 418 p.
Fisiologia da Produção	MARSHALL, B.; WOODWARD, F.I. Instrumentation for environmental physiology . Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 241 p. PEARCEY, R.W.; EHLERINGER, J.R.; MOONEY, H.A. Plant physiological ecology: field methods and instrumentation . London: Chapman & Hall, 1989. 457p.

Assunto	Referências Bibliográficas
Fixação de Nitrogênio	HAYSTEAD, A. Transfer of biologically fixed nitrogen to the non-legume component of mixed pastures. In: NUCLEAR TECHNIQUES IN IMPROVING PASTURE MANAGEMENT, 1983, Vienna. Vienna: IAEA/FAO, 1983. p.37-59.
	MARIOTTI, A.J.; MARIOTTI, F.; AMARGER, N. Use of natural ^{15}N abundance in the measurement of symbiotic fixation. In: NUCLEAR TECHNIQUES IN IMPROVING PASTURE MANAGEMENT, 1983, Vienna. Vienna: IAEA/FAO, 1983. p.61-77.
	POSTGATE, J.R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cambridge University Press. 1982. 252 p.
	SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, I. Nitrogen fixation with non-legumes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. 336 p.
	SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. Methods in legume-Rhizobium technology. Honolulu: University of Hawaii - Nifal, 1985. 367 p.
SOUTO, S.M.; DOBEREINER, J. Metodologia para medição da fixação de N_2 em raízes de gramíneas forrageiras tropicais. Pesquisa Agropecuária Brasileira , Brasília, v.19, p.553-565, 1984.	
Floração	JORDAN, B.R. The molecular biology of flowering. Wallingford: C.A.B. International, 1993. 266 p.
Fotoperíodo	LINNEMANN, A.R.; CRAUFURD, P.Q. Effects of temperature and photoperiod on phenological development in three genotypes of Bambara groundnut (<i>Vigna subterranea</i>). Annals of Botany , London, v.74, p.675-681, 1994.
	SLAFER, G.A.; CONNOR, D.J.; HALŁORAN, G.M. Rate of leaf appearance and final number of leaves in wheat: effects of duration and rate of change of photoperiod. Annals of Botany , London, v.74, p.427-436, 1994.
Hipoxia	DAVIES, D.D.; KENWORTHY, P.; MOCQUOT, B.; ROBERTS, J. The metabolism of pea roots under hypoxia. In: RANDALL, D.D.; BLEVINS, D.G.; LARSON, R.L. eds. Current topics in plant biochemistry and physiology , v.4. Columbia: University of Missouri, 1985. p.141-155.

Assunto	Referências Bibliográficas
Immunoblotting Protéico	BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H.H. Handbook of immunoblotting of proteins, v.1. Technical descriptions. Boca Raton: CRC Press, 1988. 265 p.
Lectinas	CAVADA, B.S.; MOREIRA, R. de A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal , São Carlos, v. 5, p.193-201, 1993. SHANNON, L.M.; CHRISPPEELS, M.J. Molecular biology of seed storage proteins and lectins. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1986. 239 p.
Modelos Matemáticos	AIKMAN, D.P.; BENJAMIN, L.R. A model for plant and crop growth, allowing for competition for light by the use of potential and restricted projected crown zone areas. Annals of Botany , London, v.73, p.185-194, 1994. MARCELIS, L.F.M. A simulation model for dry matter partitioning in cucumber. Annals of Botany , London, v.74, p.43-52, 1994.
Movimentos Circadianos	SATTER, R.L.; CHEN, Y.B.; PACALA, S.W.; LEE, Y. Circadian rhythms in <i>Albizia</i> leaflets of different ages. In: THOMSON, W.W.; NOTHNAGEL, E.A.; HUFFACKER, R.C. eds. Plant senescence: its biochemistry and physiology. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1987. p.215-222.
Movimentos Paraheliotrópicos	REED, R.; TRAVIS, R.L. Paraheliotropic leaf movements in mature alfalfa canopies. Crop Science , Madison, v.27, p.301-304, 1987.
NMR	ROBERTS, J.K.M. Use of high resolution ³¹ P nuclear magnetic resonance spectroscopy to study metabolism in living plant tissue. In: RANDALL, D.D.; BLEVINS, D.G.; LARSON, R.L. eds. Current topics in plant biochemistry and physiology, v.4. Columbia: University of Missouri, 1985. p.207-217.
Nutrição Mineral	MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1986. 674 p.
Ozônio	HUR, J.S.; WELLBURN, A.R. Effects of atmospheric O ₃ on <i>Azolla-Anabaena</i> symbiosis. Annals of Botany , London, v.73, p.205-209, 1994.
Radioimunoensaio	CHARD, T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques: laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1990. 290 p.

Assunto	Referências Bibliográficas
Senescência	THOMSON, W.W.; NOTHNAGEL, E.A.; HUFFACKER, R.C. eds. Plant senescence: its biochemistry and physiology . Rockville: American Society of Plant Physiologists. 1987. 255 p.
Tampões (preparo)	GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. eds. Methods in enzymology . v.1. New York: Academic Press, 1955. p. 138-146.
Tilaquóides	LAM, E.; MALKIN, R. Studies on the reconstitution of chloroplast electron transport processes. In: RANDALL, D.D.; BLEVINS, D.G.; LARSON, R.L.; RAPP, B.I. eds. Current topics in plant biochemistry and physiology, v.3 . Columbia: University of Missouri, 1984. p.33-43.
Transdutores Biofísicos	GREEN, P.B. Connecting gene and hormone action to form, pattern and organogenesis: biophysical transductions. Journal of Experimental Botany , London, v.45, p.1775-1788, 1994.
Ubiquitina	VIERSTRA, R.D.; LANGAN, S.M.; SCHALLER, G.E.; COLBERT, J.T.; HAAS, A.L. Initial characterization of the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in higher plants. In: RANDALL, D.D.; BLEVINS, D.G.; LARSON, R.L. eds. Current topics in plant biochemistry and physiology, v.4 . Columbia: University of Missouri, 1985. p.25-33.
UV-B	BALLARÉ, C.L.; BARNES, P.W.; FLINT, S.D. Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. Physiologia Plantarum , Copenhagen, v.93, p.584-592, 1995. BALLARÉ, C.L.; BARNES, P.W.; FLINT, S.D.; PRICE, S. Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. II. Time-course, comparison with flavonoid responses and adaptive significance. Physiologia Plantarum , Copenhagen, v.93, p.593-601, 1995. LIU, L.; GITZ, D.C., III; McCLURE, J.W. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. Physiologia Plantarum , Copenhagen, v.93, p.725-733, 1995.
Volume Gasoso	CALBO, A.G.; NERY, A.A. Methods to measure gaseous volume in plants. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal , São Carlos, v.6, 153-162, 1994.

APÊNDICE C

LISTA DE FORNECEDORES*

Fornecedor	Empresas Representadas [†]
<p>ACATEC Comércio e Representações Ltda Rua dos Comerciantes, 354 CEP 04.320-030 - São Paulo - SP Fone: (011) 5588-4392 Fax: (011) 5588-4919</p>	<p>APD Cryogenics Inc. CONVIRON DIONEX e outros</p>
<p>ALEM MAR Comercial e Industrial S.A. Av. Senador Queiroz, 96 - 5º andar CEP 01026-000 - São Paulo - SP Fone: (011) 229-8344 Fax: (011) 228-5407 Telex: 1123194 MAPQ BR</p>	<p>ELE International LABCONCO LI-COR SEEDBURO Wescor e outros</p>
<p>Ambriex S.A. Rua Tupi, 535 CEP 01233 - São Paulo - SP Fone: 826-6722 Fax: 67-1870 Telex: 1121348</p>	<p>Hoefer</p>
<p>ANACOM CIENTÍFICA Rua Aurora, 111 Vila Marlene CEP 09726-420 - São Bernardo do Campo - SP Fone/Fax: (011) 414-1688</p>	<p>Leco Questron e outros</p>
<p>DANON Sociedade Importadora de Equipamentos Científicos Ltda Av. Pedro II, 292 C.P. 1232 São Cristóvão CEP 20941-070 - Rio de Janeiro - RJ Fone: (021) 589-7518 Fax: (021) 589-1031</p>	<p>THOMAS</p>

[†] Firmas brasileiras de equipamentos, reagentes ou suprimentos que anunciaram seus produtos ao laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa/CNPGL.

*: Conforme material de divulgação. Para informações adicionais, consulte o fornecedor.

LISTA DE FORNECEDORES* ... - continuação.

Fornecedor	Empresas Representadas**
D.P. Instrumentos Científicos, Ltda Rua Dr. Pinto ferraz, 131 CEP 04117-040 - São Paulo - SP Fone: (011) 574-5866, 571-1117, 574-5884 Fax: (011) 571-8335	COLE-PARMER
FILTRACOM Av. Dr. Altino Gouveia, 213 CEP 13270-000 - Valinhos - SP Fone: (0192) 71-1000 Fax: (0192) 71-1645	FILTRACOM
GENOMA Biotecnologia do Brasil Ltda Rua Timbiras, 3468A Conj 02 Sala 201 CEP 30140-062 - Belo Horizonte - MG Fone: (031) 275-1240 Fax: (031) 337-9324	Promega
Genomic Engenharia Molecular Ltda Rua Itapeva, 500 Conj 5AB CEP 01332-903 - São Paulo - SP Fone: (011) 288-1188 Fax: (011) 288-4962	Genomic
Incibrás Instrumentação Científica Brasileira Ind. e Com. Ltda Rua Maria Lúcia Duarte, 512 CEP 05172 - São Paulo - SP Fone: (011) 834-1427, 834-1158, 834-2181 Fax: (011) 834-6038	Dupont Eppendorf E-C Apparatus Precision GIBCO-BRL e outros
Lintfort Associates, Ltda Caixa Postal 33018, Leblon CEP 22442-970 - Rio de Janeiro - RJ Fone: (021) 294-2934, 294-4794	ElettronicaVeneta NEL

* Firmas brasileiras de equipamentos, reagentes ou suprimentos que anunciaram seus produtos ao laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa/CNPGL.

** Conforme material de divulgação. Para informações adicionais, consulte o fornecedor.

LISTA DE FORNECEDORES* ... - continuação

Fornecedor	Empresas Representadas**
Lodan Representações Comerciais S/C Ltda Av. Eng. Caetano Alvares, 527 B. do Limão CEP 02550 - São Paulo - SP Fone: (011) 857-0678 Fax: (011) 265-6232	Sorvall
Micronal S.A. Av. Francisco Sales, 104 Floresta CEP 30150-200 - Belo Horizonte - MG Fone: 222-5030, 226-7720 Fax: (031) 201-0538	HERMLE Micronal e outros
PROMOLAB Av. Mateo Bei, 1074 CEP 03949-100 - São Paulo - SP Fone: (011) 919-2939, 919-8803 Fax: (011) 962-3771	PROMOLAB
Pró-Química Com. Export. e Import. Ltda Rua Dom Viçoso, 222 CEP 30720-260 - Belo Horizonte - MG Fone: (031) 411-2069 Fax: (031) 464-5653	Aldrich Fluka SIGMA
RIO lab minas Produtos e Equip. para Laboratório Ltda Rua Sabinópolis, 103 Carlos Prates CEP 30710 - Belo Horizonte - MG Fone: (031) 464-9051 Telex: (031) 3706	BELART
Schott-Zeiss do Brasil Ltda Av. Nações Unidas, 21711 CEP 04795-100 - São Paulo - SP Fone: (011) 524-4111 Fax: (011) 524-5232	ZEISS

* Firmas brasileiras de equipamentos, reagentes ou suprimentos que anunciaram seus produtos ao laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa/CNPGL.

** Conforme material de divulgação. Para informações adicionais, consulte o fornecedor.

LISTA DE FORNECEDORES*... - continuação

Fornecedor	Empresas Representadas**
Sigma-Aldrich Chemical Representações Ltda Rua Sabará, 566 Conj 53 CEP 01239-010 - São Paulo - SP Fone: (011) 231-1866 Fax: (011) 257-9079	Aldrich SIGMA
SUPEROHM Ltda Rua Vitório Furlani, 877 Algodão CEP 13400 - Piracicaba - SP Fone: (0194) 21-2234 Fax: 21-0100 Telex: 19-7730 SOHM BR	SUPEROHM
TECNAL Equipamentos para Laboratório Ltda Rua Tiradentes, 852 CEP 13400 - Piracicaba - SP Fone: (0194) 34-9033 Fax: (0194) 34-7571 Telex: 19-2184, 19-2893 TECP BR	TECNAL
TROX TECHNIK Central de Vendas Rua Alvarenga, 2.025 CEP 05509 - São Paulo - SP Fone: (011) 814-5000 Fax: (011) 815-4304	TROX

* Firms brasileiras de equipamentos, reagentes ou suprimentos que anunciaram seus produtos ao laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa/CNPGL.

** Conforme material de divulgação. Para informações adicionais, consulte o fornecedor.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abreviaturas, v-ix

Absorbância, 19, 21, 22, 43, 44, 46, 50, 60, 62, 64, 69, 71, 74, 79, 80, 82, 91, 165, 166, 167, 173, 185

Acetato de Cádmio, 51

Acetato de Chumbo, 57

Acetato de Etila, 37, 188, 189, 190, 191, 193

Acetato de Magnésio, 93

Acetato de Potássio, 116

Acetona, 34, 41, 42, 47, 51, 54, 55, 67, 68, 69, 71, 74, 96, 97

Acetil Aldeídos, 79

Acid Blue, 46

Ácido Acético, 5, 37, 51, 54, 57, 60, 63, 79, 80, 97, 193

Ácido Adenílico, 77, 80

Ácido 1,2,4-aminonaftolsulfônico, 164

Ácido Ascórbico, 51

Ácido Aspártico, 52

Ácido Citidílico, 77

Ácido Cítrico, 37, 179, 191

Ácido Fórmico, 78, 188

Ácido Fosfomolibdico, 44

Ácido Fosfotungstênico, 44

Ácido Glutâmico, 52, 171

Ácido Guanílico, 77

Ácido Indolacético Oxidase, 178

Ácido Oxálico, 54

Ácido Perclórico, 53, 54, 55, 77, 78, 79, 80, 92

Ácido Pírico, 60

Ácidos Graxos, 96, 98

Ácido Silícico, 96

Ácidos Nucléicos, 27, 77-90

cuidados, 77

determinação, 77-80

Ácido Sulfossalicílico, 64

Ácido Tricarboxílico, 145

Ácido Uridílico, 77

Aconitase, 178

Acrilamida, *ver* PAGE

Açúcares, 53, 54, 55, 56, 59, 62, 184

analisador automático, 64

Adenil Quinase, 178

Adenosina, 93

ADP, 145, 183

Adsorção, 25, 26

Ag, 37, 38, 115, 157

Agar, 115, 181

Agarose, 84, 85, 92

AgCl, 115

AgNO₃, 37, 97

Alanina, 52

Alanina Transaminase, 178

Albumina, 38

Álcool Isoamil, 82

Aldeído Acético, 79, 80

Aldolase, 178

Aleurona, 165

Alfafa, *ver* *Medicago sativa* L.

Amido, 53, 54, 55, 56, 61, 63, 78, 165, 166, 168, 178, 183-185

cuidados, 183

extração, 184-185

grânulos, 183, 184

síntese, 183-185

Amilase, 178, 183

α -Amilase, 56, 57, 60, 63, 165-169

atividade, 167

cuidados, 165

purificação, 166-167

Amiloglicosidase, 56, 63

Amilopectina, 63, 185

Amiloplastos, 183

Amilose, 185

Aminoácidos, 46, 49-52, 109, 168

análise qualitativa, 51-52

análise quantitativa, 50-51

cuidados, 49

extração, 49-50

Aminolipídios, 98

Aminopectidase, 178

Amostra, 39, 50, 67, 87-88

caule, 63, 87, 107, 191

coleóptilo, 191

cotilédones, 165, 166-167

diluição, 9, 43, 58, 82, 89, 165

discos foliares, 61, 67, 125, 151, 156,

157, 171

epicótilo, 137, 138, 140

epiderme, 50, 113, 114
 folhas, 34, 61, 73, 78, 87, 130, 131, 132, 152, 154, 171, 183, 191
 hipocótilo, 55, 191
 liofilização, 53, 55, 63, 87
 maceração, 34, 41, 43, 49, 50, 54, 73, 78, 81, 88, 180
 moagem, 5, 53, 55, 63, 70, 87-88
 nervuras, 73, 133
 pecíolos, 73, 95, 129, 130, 132, 133
 preparo, 34, 41, 42, 43, 49, 50, 55, 60, 61, 73, 78, 91, 159, 187
 raízes, 61, 130, 163, 184, 199
 secagem, 53, 61, 63, 70
 sementes, 50, 54, 165

AMP, 79

Anabolismo, 183

Angiospermas, 178

Anidrase Carbônica, 38

Anticorpos Monoclonais, 199

Apoplasto, 129

Arginina, 52

Arroz, 178

Asparagina, 52

Aspartato Aminotransferase, 178

Aspartato Transaminase, 178

ATP, 62, 145, 146, 183

ATPase, 113, 163-164

atividade, 164

cuidados, 163

purificação, 163

ATP Difosfatases, 163

Autoclave, 3, 57

Auto-radiografia, 39

Auxinas, *ver* Hormônios - IAA

Aveia, 53, 178

Azul de Bromofenol, 35, 36, 84, 92

Azul de Bromotimol, 98

Azul de Coomassie, 37, 38, 45, 46, 168

Azul de Metileno, 83, 84

Azul de Tolueno, 83

Azul de Toluidina, 84

B

BaCl₂, 107

Bacillus licheniformis, 63

Balanço Hídrico

planta, 125-143

solo, 199-200

Banho-maria, 34, 41, 42, 50, 55, 57, 58, 59,

60, 61, 63, 78, 88, 127, 161, 173

Batata, *vide Solanum tuberosum* L.

Benzeno, 54, 97

BGG, 42

Biocomputação, 200

Bioensaio, 187, 190-191

Biologia Molecular, 87, 200-201

Bioquímica Vegetal, 201

Biossensores, 201

Bisacrilamida, *ver* PAGE e SDS-PAGE

Bissulfito de Sódio, 60

BL, 154

BME, 36, 47, 82, 89, 167

Bomba de Pressão, 129-136, 141

cuidados, 129

limitações, 134

operação, 130-132

Borato de Sódio, 179

BSA, 42, 43, 44, 45, 46, 167, 173

C

¹³C, 193

¹⁴C, 39, 147

Ca, 103, 108

Ca⁺⁺, 113, 116

CaCl₂, 107, 167, 168

CaCO₃, 68

Ca(H₂PO₄)₂.H₂O, 101

Câmara de Pressão, 109

Câmara de Crescimento, 5, 201

Ca(NO₃)₂.4H₂O, 101, 104, 107

Capacitância, 152

Capela, 5, 98, 109, 190

Carboidratos, 53-65, 97, 185

ácido-digeríveis, 58

antrona, 55, 56, 58, 59, 98, 185

análise quantitativa, 53-65

cuidados, 53, 56

estruturais, 54

extração, 54-58, 60-61

extração enzimática, 56-58

método de Dubois, 55, 56, 59, 167

método de Smith, 56-58

método de Teles, 55, 56, 58, 60

microplacas, 60-63

não estruturais, 53, 55-65

- Carboxilação, 147
Carboximetil, *ver* CM
Carboxissomos, 201
Carotenóides, 69
Casa de Vegetação, 87, 201
CaSO₄.2H₂O, 101, 108, 155, 163, 189
Catabolismo, 145, 183
Catalase, 178
Caule, 109, 171
Caupí, *ver* *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
Célula, 113, 115, 137-138
Células-guardas, 113, 115
Células Somáticas, 77
Celulose, 28, 54, 78, 188
Centrifugação, 15-17, 34, 42, 43, 49, 50, 55, 57, 58, 61, 73, 74, 78, 79, 81, 82, 88, 91, 92, 95, 96, 145, 159, 160, 163, 166, 167, 184, 185, 190, 193
 cuidados, 15
 microcentrifugação, 63, 88, 109
Centrífugas, 5, 7, 15-17
 cuidados, 7, 17
 força centrífuga, 15-16
 operação, 17
 rotor, 17
Cereais, 102
Cevada, 53, 111, 178
CH₂Cl₂, 193
Choque Osmótico, 91, 101
β-ciclodextrina, 167
Cimostatina, 173
Cisteína, 52, 173
Cistina, 52
Citoplasma, 116
Citrato de Sódio, 179
Citros, 178
Clorofila, 41, 42, 55, 67-71, 74, 188
 clor a, 67-70, 73, 151, 156-158
 clor b, 67-70, 73
 cuidados, 67
 extração, 68
 estimativa, 68, 70
 método de Arnon, 67-68
 medidor portátil, 67
 partição, 68-69
Clorofórmio, 5, 42, 49, 50, 55, 63, 78, 82, 87, 88, 89, 188
Cloroplastos, 73-74, 81, 151, 156, 183
 diluição, 74
 suspensões, 73-74
CM, 28
Cochlearia armoracia, 174, 178
Coletor de Frações, 167
Colidina, 51
CO₂, 45, 113, 145, 146, 147, 151, 154, 155, 156
Composição da Luz, 201
Computador, 115, 117, 122, 154, 174, 184
Condutância, 39, 115, 117, 121, 122, 154
Coníferas, 178
Corrente, 35, 39
Cotilédonos, 109
Crescimento, 77, 91, 134, 137-138, 140, 199
Criopreservação, 202
Cromatografia, 25-31, 51, 82, 183
 de adsorção em leito expandido, 28-29
 de afinidade, 27-28, 167
 de camada fina, *ver* TLC
 de eluição, 27
 de troca iônica, 28, 54, 92, 193
 em coluna, 25-26, 82, 96, 97, 167, 185
 em papel, 29-30, 51, 69-70, 188
 fase estacionária, 25, 26, 27, 28
 fase móvel, 25, 26, 27
 gasosa, 25, 26, 187
 líquida, *ver* HPLC
 plana, 25
CuCl₂.2H₂O, 104
Cucurbita pepo L., 104
Cultura de Tecidos, 187, 202
Curva-Padrão, 8, 44, 45, 46, 50, 58, 59, 125, 166, 172
Curva P-V, 129, 131-132, 142
CuSO₄.5H₂O, 44, 45, 101
- D**
- DCPIP, 73, 74, 75, 181
DEAE, 28
Déficit Hídrico, 117
Densidade, 10, 83
Densitometria, 175, 182, 202
Desidrogenase Alcoólica, 178, 181
Desoxirribose, 79
Diaforase, 178, 181
Diálise, 63, 64, 159-160, 167, 168
Diazometane, 193
Dicloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina, 181

- 2',7'-Dicloro Fluorescina, 98
 Difenilamina, 79, 80, 108
 Diglicerídios, 97
 Dimetil Formamida, 27
 Discos Foliares, 53, 61
 Dissacarídeos, 58, 165
 DMSO, 173, 184
 DNA, 77-80
 DNA Genômico, 14, 87-90
 amostragem, 87
 cuidados, 87
 determinação, 89
 extração, 87-90
 D.O., 44, 45, 46, 58, 59, 62, 69, 79, 80, 82,
 92, 161, 172
 Dosséis, 117
 DTT, 91, 163, 173
- E**
- Echinochloa utilis* Ohwi et Yabuno, 111
 EDTA, 47, 85, 90, 101-102, 173
 Efeito Peltier, 125
 Elementos Marcados, *ver* Radioisótopos
 Eletrodo Clark, 151, 156-158
 calibração, 156
 operação, 156-158
 Eletroforese, 33-40, 82-85, 92, 173
 com circulação, 34-35
 corrente constante, 35, 83
 cuidados, 33, 177
 de capilaridade, 202
 em gel de agarose-acrilamida, 92
 em gel de amido, 177-182
 em gel de poliácridamida, *ver* PAGE
 fonte de energia, 34, 35, 83, 84, 85, 111,
 177
 formador de gradientes, 37-38
 voltagem constante, 35
Elytrigia repens (L.) Beauv., 193
 Endopeptidase, 178
 Enolase, 178
 Enzima Máfica, 178
 Enzimas, 27, 53, 56, 57, 159-182
 atividade, 41
 nomenclatura em português, 159, 162
 soluções, 57, 60, 184
 Eritrócitos Bovinos, 38
 Ervilha, *ver* *Pisum sativum* L.
- Escherichia coli*, 38
 Espaçadores, 34
 Espectrofotometria, 19-23, 69
 brancos, 20, 21, 22, 41, 43, 44, 45, 46,
 57, 69, 80, 161, 164, 166, 172
 cuidados, 19
 padrões, 43, 44, 50, 57, 58, 79, 93, 161,
 167
 Espectrofotômetro, 5, 19-23, 43, 56, 60, 68,
 74, 89, 92, 161, 164, 166
 corrente no escuro, 20
 modalidades, 20-22
 módulo de concentração, 22, 23
 operação, 21-23
 Espectrometria de Massa, 187
 Espinafre, 174
 Estatística Experimental, 202
 Esterase, 178
 Éster Dietílico, 188
 Estômatos, 113, 114, 117, 118, 154
 Estresse de Relaxamento, 138
 Estresse Térmico, 91
 Estufa, 3, 53, 61, 62, 97, 98
 Etanol, 12, 13, 34, 42, 49, 50, 51, 54, 55, 56,
 58, 61, 77, 78, 81, 88, 89, 90, 96, 97, 98,
 109, 181, 182, 183, 184, 188, 189, 190
 Etanolamina, 54, 98
 Éter, 34, 54, 55, 68, 69, 96, 97
 Etilenoglicol, 51
 Eucalipto, 178
 Evaporador Giratório, 95, 188
- F**
- FAD, 173
Fast Blue BB Salt, 181
 Fe, 102, 103
 Fe⁺⁺, 73
 Fe⁺⁺⁺, 102
 FeCl₂.4H₂O, 102
 FeCl₃, 80
 FeEDTA, 101-102
 Feijão, *ver* *Phaseolus vulgaris* L.
 Feijão Mungo, *ver* *Vigna mungo* L.
 Fenol, 5, 51, 55, 56, 59, 60, 81, 82
 Fenolftaleína, 44
 Fenil Alanina, 52
 Fe(OH)₃, 102
 FeSO₄.7H₂O, 102

- FIA, 173, 174
Figura, 22, 26, 29, 30, 64, 70, 108, 120, 126, 133, 134, 140, 152, 153, 174
Filtração, 34, 41, 42, 45, 46, 51, 56, 57, 61, 64, 68, 74, 91, 95, 96, 145, 159, 161, 164, 167, 184, 188, 190
Fisiologia da Produção, 202
Fixação de Nitrogênio, 203
Fluorescência, 20, 151, 156-158
Fluorografia, 39
Folin, 41, 44, 47, 163
Folha, 111, 113, 117
Formaldeído, 37
Fornecedores, 207-210
Forno de Microondas, 3, 53, 85, 177
Forrageiras, 53, 165, 187
Fosfatase Ácida, 159-162, 178
 atividade, 161-162
 cuidados, 159
 purificação, 159-161
Fosfatase Alcalina, 178
Fosfato, 103, 108, 164
Fosfato de P-nitrofenila, 161
Fosfofrutoquinase, 178
Fosfoglicolato, 147
Fosfoglicose Isomerase, 62
Fosfolipídios, 95, 97, 98
Fosfomanoisomerase, 178
Fosforilase, 38, 183
 atividade, 184
Fotodecomposição, 20
Fotodiodo, 157
Fotografia, 38, 70, 108, 182, 184
Fotômetros, 22, 64
Fotoperíodo, 203
Fotorrespiração, 147-149
Fotossíntese, 151-158, 147
 ponto de compensação, 148
Fracionamento, 27, 33, 82, 92, 97, 174, 183
Frutosanos, 53, 56, 57
Frutose, 57, 59, 61, 62, 184
Frutose-6-fosfato, 62
Fumarase, 178
- G**
- Gaiola de Faraday, 113, 114
Galactolipídios, 95, 98
 α -Galactosidase, 178
 β -Galactosidase, 38, 178
GC/EM, 187, 193
Gel, 27, 33, 81, 83-85, 92, 161, 168
 de amido, 177-182
 coloração, 37, 39, 181-182
 de concentração, 36, 168
 de corrida, 34, 35, 36
 de disco, 83-85
 de poliacrilamida, *ver* PAGE
 de vedação, 34, 36
 fatiamento, 181
 fixação, 37, 182
 preparação, 177-180
 revelação, 37, 39
 secagem, 38
Giberelinas, *ver* Hormônios - GA
Gipsita, 188, 189
Girassol, *ver Helianthus annuus* L.
Glicerol, 3, 36, 47, 182
Glicina, 36, 52, 147, 168, 179
Glicolato, 147
Glicolipídios, 97
Glicose, 53, 56, 58, 60, 61, 62, 63, 145, 146, 167, 183, 184, 185
Glicose-1-fosfato, 183, 184
Glicose-6-fosfato Desidrogenase, 62, 178
 β -Glucosidase
Glutamato Desidrogenase, 178
Glutamina, 171, 174
Gramíneas, 53, 163, 165, 171
Grau de Saturação, 11
Gravidade Específica, 10-11
- H**
- ^2H , 193
 ^3H , 39
 H_3BO_3 , 98, 101, 104, 179
HCl, 12, 14, 35, 42, 46, 57, 58, 78, 80, 103, 166, 168, 172, 173, 181, 191
Helianthus annuus L., 130, 133
Hemiceluloses, 54
Hexacianoferrato de Potássio, 64
Hexoses, 59, 61, 62
Hexoquinase, 62
Hidrindantina, 51
Hidrólise, 46, 77, 79, 92, 164, 166
Hidroponia, 101
Hidroxiprolina, 51

- Higrômetro, 141, 155
Hipoxia, 203
Histidina, 52, 179
 $H_2MoO_4 \cdot H_2O$, 101
 HNO_3 , 108
Hormônios, 27, 165, 177, 187-194
 ABA, 187, 188, 189, 190, 193
 citocininas, 188
 cuidados, 187
 GA, 165, 187, 188, 190-191, 192
 IAA, 137, 187, 188, 189, 191, 193
 purificação, 192-193
 H_3PO_3 , 45, 46
HPLC, 25, 53, 63-64, 168
 H_2SO_4 , 12, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 79,
 80, 96, 98, 102, 108, 172, 188, 189, 190
- I**
- I, 98, 165, 166
 I_2 , 166, 168, 183
IgG, 174
Imunoblotting Protéico, 159, 173-174, 204
Intensidade Luminosa, 62, 74, 75, 111
Instron, 138
Invertase, 60, 62
IRGA, 146, 147, 151-155
 calibração, 154, 155
 cuidados, 155
 microprocessador, 154-155
 operação, 152-155
Isocitrato Desidrogenase, 178
Isoleucina, 52
Isopropanol, 82, 88, 97, 189
Isozimas, 177-182
- K**
- K, 102, 103
 K^+ , 47, 113
KCl, 7, 81, 91, 92, 95, 113, 114, 115, 116,
 138, 163
 KH_2PO_4 , 101, 104, 145, 166, 184
 K_2HPO_4 , 104, 173, 188, 191
KI, 45, 166, 168, 183
Kjehldal, 41
 K_m , 168
 KNO_3 , 101, 104, 172, 173, 181
KOH, 54, 59, 63, 78, 92, 96, 102, 103
 K_2SO_4 , 101, 107, 115
- L**
- Laboratório, 3-8, 104, 126
 gerenciamento, 5-8
 livro de anotações, 5
 lixo, 5
 normas, 3-8
 segurança, 3-4, 6, 39
Lactuca sativa L., 191
Lectinas, 204
Leguminosas, 53
Lei de Beer, 19, 75
Lei de Lambert, 19
Lei dos Gases Perfeitos, 154
Leitora de Microplacas, 61, 62
Leucina, 50, 52
Leupeptina, 173
Lignina, 54
LiOH, 179
Lipídios, 42, 54, 55, 63, 78, 95-99
 análise qualitativa, 96
 extração, 95, 96
 isolamento, 95
 não saponificados, 96
Lisímetro de Pesagem, 120-121
Lisina, 52
Luciferase, 145
Luciferina, 145
Lycopersicon esculentum Mill., 98, 101, 109,
 178
- M**
- Malato, 146, 181
Malato Desidrogenase, 178, 181
Maltose, 165, 183
Mandioca, 58
Mangifera indica L., 70
Marcadores de Peso Molecular, 33, 34, 38,
 168
Medicago sativa L., 53, 178, 183-184
Membrana Citoplasmática, 91, 95, 113-116,
 127, 163-164
Mesófilo, 73
Metanol, 5, 37, 42, 45, 49, 67, 69, 78, 95, 96,
 97, 98, 187, 188, 191, 193
Metassulfato de Fenazina, 62

- Metilação, 193
 Metionina, 52
 Mg, 103, 107, 108
 Mg⁺⁺, 47
 MgCl₂, 78, 81, 91, 92, 107, 181
 MgCO₃, 68
 Mg(NO₃)₂·6H₂O, 101
 MgSO₄·7H₂O, 101, 104, 163
 Microeletrodos, 113, 114-115, 116
 preparo, 114-115
 puller, 114
 Micromanipulador, 114, 139
 Micrômetro, 115, 139, 140, 141
 Microplacas, 53, 60-63
 cuidados, 62
 Microprocessador, 117, 141, 154
 Microscopia, 1, 117
 eletrônica, 1
 Microscópio, 107, 108, 113, 114, 116, 139
 Microssonda, 111
 Microtécnicas, 1
 Micrótomo, 61
 Microvoltímetro, 125, 127
 Milho, *ver* *Zea mays* L.
 Miosina, 38
 Mitocôndrios, 145-146
 Modelos Matemáticos, 204
 Módulo de Elasticidade, 135
 Moinho, 61, 88
 Molalidade, 11
 Molaridade, 9
 Monoésteres, 77
 Monofosfatos, 77
 Monoglicéridios, 97
 Monômeros, 56
 Movimentos Circadianos, 204
 Movimentos Paraeliotrópicos, 204
 MnCl₂·4H₂O, 101, 104
 MoO₃, 104, 107
 MSTFA, 193
 MTT, 181

N

 N, 41, 67, 103, 129, 130, 131, 151
 N₂, 54, 81, 88, 91, 96, 109, 125, 127, 129,
 132, 167, 193
 Na⁺, 113
 NaCl, 11, 13, 14, 54, 55, 78, 81, 87, 89, 174
 Na₂CO₃, 44
 NAD⁺, 171, 181
 NADH, 145, 171, 172, 181
 NADP⁺, 62, 171
 NADPH, 171
 Na₂EDTA, 84, 159, 163, 171, 172, 179
 NaF, 184
 Na₂FeEDTA, 102-103
 NaHCO₃, 181, 187
 NaH₂PO₄, 84, 85
 Na₂HPO₄, 107, 145
 N-(3-aminopropil)-morfolina, 179
 NaOAc, 51, 57, 60, 82, 88, 89
 NaOH, 11, 14, 37, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 54,
 55, 57, 60, 98, 102, 161, 164, 172, 179,
 185
 Na₃PO₄, 108
 Na₂SO₄, 13, 96, 191, 192
 N-butanol, 29, 34, 51, 83
Neutronix, 173
 NH₄⁺, 41, 98, 103, 171, 189
 NH₄Cl, 108
 N-hexano, 193
 NH₄MgPO₄·6H₂O, 107
 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 108, 164
 NH₄OAc, 14, 88, 90
 NH₄OH, 37, 97, 103
 (NH₄)₂PO₄, 108
 NH₄SO₄, 11, 12, 160, 167
 Ninidrina, 51, 98, 109
 Nitrato Cúprico, 51
 Nitrato Redutase, 171-175, 181
 atividade, 171, 173
 cuidados, 171
 indução, 171-172
 NMR, 204
 N-(1-naftil)etilenodiamina, 172, 173
 NO₂⁻, 171, 172, 173-175
 NO₃⁻, 103, 108, 171, 172
 Normalidade, 10, 44
 Núcleos, 91
 Nucleosídeos, 77
 Nucleotídeos, 28, 78, 79, 92
 Número de Avogadro, 9-10

- Nutrição Mineral, 101-105, 204
 deficiências, 101, 103
 microelementos, 101, 104
- O**
- O₂, 73, 109, 129, 132, 145, 147, 148, 156
 Octanol, 88, 89
 Oligo-(dT)-celulose, 82
 Orcinol, 80, 93
 Osciloscópio, 115
 Osmolalidade, 141
 Osmolaridade, 10, 12
 Osmômetro, 109
 de ponto de congelamento, 140
 de pressão de vapor, 128, 137, 140, 141
 Ovalbumina, 38
 Oxalato de Amônio, 54
 Oxalato Férrico, 73
 Oxiluciferina, 145
 Ozônio, 204
- P**
- P, 103
 PAGE, 5, 33, 35, 39, 81, 82-83, 84, 85, 92, 168, 174, 181
 SDS-PAGE, 33-40, 82-83, 168, 177
 PAR, 113
 Parede Celular, 91
 extensibilidade, 137, 138
 relaxamento, 127, 137-138
 Partição, 25, 26
 Pb, 56
 PbOAc, 58, 98
 Pectinas, 54
 PEG, 167
 Pentoses, 59
 PEP, 181
 PEP Carboxilase, 181
 Perclorato de Magnésio, 155
 Perclorato de Potássio, 78
 Percoll, 73
 Permanganato de Potássio, 98
 Permutadores Iônicos, 28
 Peroxidase, 178
 Peróxido de Hidrogênio, 174
 Petúnia, 178
Phaseolus vulgaris L., 104, 159, 178, 183
Photinus pyralis, 145
 Pi, 145, 164
 Pigmentos, 41, 42, 49, 55, 68-69, 188
 Pinheiro, 178
 Piruvato, 145, 146
Pisum sativum L., 50, 104, 137, 140, 178
Plasmodesmata, 113
 PMS, 181
 P-nitrofenol, 161
 Poliacrilamida, *ver* PAGE e SDS-PAGE
 Polirribossomos, 91-93
 análise qualitativa, 92
 análise quantitativa, 92-93
 extração, 91
 fracionamento, 92
 Polissacarídeos, 54
 Porômetro, 5, 117-123
 calibração, 122-123
 de difusão dinâmica, 117, 122-123
 de estado estável, 117, 121-122
 Potencial Elétrico, 113
 Potencial Hídrico (ψ), 117, 125-143
 Potencial Iônico, 113-116
 câmara experimental, 113-114, 115
 determinação, 115
 eletrônica, 115
 experimentação, 116
 Potencial Osmótico (ψ_{π}), 109, 125-143, 183
 Potômetro, 118-120
 Problemas Frequentes, 39, 134
 Prolina, 51, 52
 Propanol, 173, 189
 Proteases, 171, 173
 Proteínas, 11, 27, 33, 34, 35, 41-48, 56, 78, 81, 83, 91, 159, 161, 177
 análise quantitativa, 41-48
 cuidados, 41
 extração, 41-43
 interferências, 46-47
 método do biureto, 41, 45, 47
 método de Bradford, 41, 42, 45, 46, 47, 167
 método de Lowry, 34, 41, 42-44, 46, 47, 161, 163
 PSA, 35, 39, 84, 85, 159
 PSI, 73
 Psicrometria de Termopar, 125-128
 cuidados, 125
 limitações, 126-127

Psicrômetro de Termopar, 5, 109, 125-128, 141, 155
 calibração, 125
 com guilhotina, 127-128
in situ, 127, 142
 isopiéstico, 126-127, 137, 141
 operação, 127
 PSII, 73, 151
 Pt, 156, 157
 Pulso de Calor, 111-112
 cuidados, 111
 PVPP, 181, 188, 191

Q

QAE, 28, 193
Quantum, 154
 Quelato de Ferro, *ver* FeEDTA
 Quelato de NH_4^+ , 103

R

Rabanete, *ver Cochlearia armoracia*
 Radioimunoensaio, 204
 Radioisótopos, 1, 3, 39, 187
 Raio-X, 39
 Raízes, 118, 171, 183
 Reação de Hill, 73-75
 Reagentes, 4, 5, 6, 43, 44, 45, 46, 50-51, 55, 58, 59-60, 79, 84, 85, 89, 91, 107, 108, 166, 172-173
 Referências Bibliográficas, 2, 8, 14, 17, 23, 31, 40, 47-48, 52, 64-65, 71, 75, 80, 85-86, 90, 93, 98-99, 104-105, 109, 112, 116, 123, 128, 135-136, 142-143, 146, 148-149, 158, 162, 164, 168-169, 175, 182, 185, 193-194, 199-206
 Refluxo, 85, 96
 Regressão, 8, 38, 44, 45, 46, 50, 58-59, 62, 125, 172
 Reguladores do Crescimento, *ver* Hormônios
 Relações Hídricas, 125-143
 Repolho, 178
 Resistência, 114, 115, 116, 117, 118, 121
 Respiração, 103, 145-146, 156
 Retículo Endoplasmático, 91
 R_r, 30, 33, 38, 85, 97, 188, 189
RhodamineB, 98
 Ribose, 93

Ribossomos, 81
 RNA, 9, 77-80, 89, 91
 cuidados, 81
 determinação, 82
 extração, 81-82
 fracionamento, 82-83
 mRNA, 82
 RNase, 91
 RP-HPLC, 187, 191-192, 193
 Rubisco, 147
 RuBP, 147, 148

S

S, 102, 103
³⁵S, 39
 Sacarose, 47, 56, 59, 60, 61, 62, 73, 84, 85, 91, 92, 93, 95, 145, 146, 159, 163, 184, 191
 gradiente, 92, 93, 102, 163-164
Salix pentandra, 193
 Sarcosil, 82
 Scholander, *ver* Bomba de Pressão
 SDS, 33, 34, 35, 46, 81, 82, 83, 84
 Secador de Géis, 182
 Semente, 111, 165, 166
 Senescência, 205
Sephadex, 28, 161, 193
Sepharose, 167, 174, 185
 Seiva, 109, 111, 132, 133
 Serina, 52, 98, 147
 SI, 1, 195-197
 Soja, 178
Solanum tuberosum L., 184, 185
 Solubilidade, 12
 Solução Nutritiva, 101-105, 113, 118, 120, 171
 cuidados, 101
 Soluções, 6, 9-14
 ajuste do pH, 28, 34, 41, 51, 57, 60, 63, 78, 96, 102, 103, 191
 concentrações, 9-14
 cuidados, 9
 exercícios, 11
 saturação, 11, 160
 Soluções-estoque, 10, 12, 34, 35-36, 44, 50, 60, 101, 103
 Sonda de Pressão, 137-143
 amostragem, 140

- cuidados, 137
 operação, 138-139
Sorghum bicolor L. Moench, 111
 SP, 28
 Succinato, 146
 Sulfato, 103, 107
 Sulfanilamida, 172, 173, 181
 Sulfeto de Amônio, 98
 Sulfolipídios, 98
 Superóxido Dismutase, 178
- T**
- Tabaco, 178
 Tabela, 26, 44, 45, 47, 52, 101, 103, 104, 119, 141, 160, 178, 179
 Tabela Periódica, 211
 Tampões, 205
 acetato, 51, 56, 57, 60, 63, 84, 161, 167, 168
 Ca⁺⁺-HEPES, 113, 114
 citrato, 62
 CTAB, 87-90
 fosfato, 43, 74, 78, 82, 95, 145, 146, 165, 171, 172, 174, 181, 188, 191
 fosfato-citrato, 191
 HEPES, 47, 62
 PEB, 34
 TE, 88, 89
 Tris, 35, 36, 43, 46, 47, 85, 89, 90, 93, 179, 181
 Tris-acetato, 63
 Tris-ATP, 163
 Tris-borato, 5
 Tris-glicina, 36, 168, 179
 Tris-HCl, 81, 84, 91, 92, 159, 160, 167, 168, 172, 173
 Tris-MES, 163
 Tartarato Cúprico Alcalino, 44
 Tartarato de Ferro, 101
 Tartarato de Sódio e Potássio, 44, 45
 TCA, 34, 42, 47
 TEMED, 36, 39, 84, 85
 Termopar, 109, 111, 118, 141
 Tilaquóides, 95, 96, 151, 205
 Timol, 57
 Tiocianato de Guanidina, 82
 Tirosina, 52
 TLC, 30-31, 77, 96, 97, 187-190
 operação, 188-190
 solventes, 189
 Tomate, *ver Lycopersicon esculentum* Mill
 Tradução *in vitro*, 82
 Transdutor de Posição, 138
 Transdutor de Pressão, 137, 140
 Transdutores Biofísicos, 205
 Transmitância, 21
 Transpiração, 117-123, 135, 154
 cuidados, 117
 Transporte Iônico, 113, 163
 Trevos, 53
 Tricina, 181
 Triglicerídios, 97
 Trigo, 190, 191
 Triptofano, 52
 Triton X-100, 47, 91
 Tubérculos, 183
 Turgor (ψ_p), 125-143
- U**
- UA, 62, 63, 166, 167, 172
 Ubiquitina, 205
 UDP, 183
 Ultravioleta, *ver* UV
 Umidade Relativa, *ver* U.R.
 Unidades
 conversão, 195-197
 símbolos, v-ix
 U.R., 7, 118, 119, 120, 121, 122, 125, 154, 155
 UTP, 183
 UV, 21, 30, 79, 98, 187, 188, 189, 190, 205
- V**
- Vacúolo, 68, 116
 Vaga-lume, *ver Photinus pyralis*
 Valina, 52
 Vesículas, 163
Vicia faba L., 113-116
 Vidraria, 4, 6
Vigna mungo L., 104, 145, 146
Vigna unguiculata (L.) Walp., 104, 165, 166
 Violeta de Iodonitrotetrazólio, 62
 Vitaminas, 27
 V_{max}, 148, 168
 Voltagem, 35, 39

Voltímetro, 121
Volume Apoplástico, 134
Volume Específico, 11
Volume Gasoso, 205

W

Western blot, 33

X

Xantofilas, 69
Xilema, 107-109, 129-136
 cuidados, 107
 exsudação, 107-109, 129, 131, 132, 133,
 135

Y

Yield Threshold, 137-138, 139

Z

Zea mays L., 87, 111, 185
ZnSO₄.7H₂O, 101, 104

Embrapa

GADO DE LEITE

