

ANEXOS

ÍNDICE

<u>ASSUNTO</u>	<u>PÁGINA</u>
----------------	---------------

Anexo I – Exemplos de meios específicos para o crescimento de bactérias fixadoras de azoto.....*i*

Anexo II – Localização, identificação e caracterização dos locais de amostragem.....*ii*

Anexo III – Soluções utilizadas.....*vi*

ANEXO I

Exemplos de meios específicos para o crescimento de bactérias fixadoras de azoto

1 – Meio para bactérias fixadoras de azoto (1000ml) (Holt e Krieg, 1994):

KH_2PO_40,4g

K_2HPO_40,1g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,2g

NaCl0,1g

FeCl_310mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$2mg

Malato de sódio ou outra fonte de carbono...5g

Extracto de levedura.....50mg

pH = 7,2 ±0,1

Nota:

Para o crescimento de *Azotobacter chroococcum* e *Azotobacter vinelandii*, este meio deve ter um pH de 7,6, a fonte de carbono deve ser manitol e devem ser adicionados 10% de extracto de solo.

2 – Meio para *Azotobacter* spp. (1000ml) (Holt e Krieg, 1994):

Manitol.....2,0g

K_2HPO_40,5g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,2g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,1g

pH = 7,3-7,6

ANEXO II

Localização, identificação e caracterização dos locais de amostragem

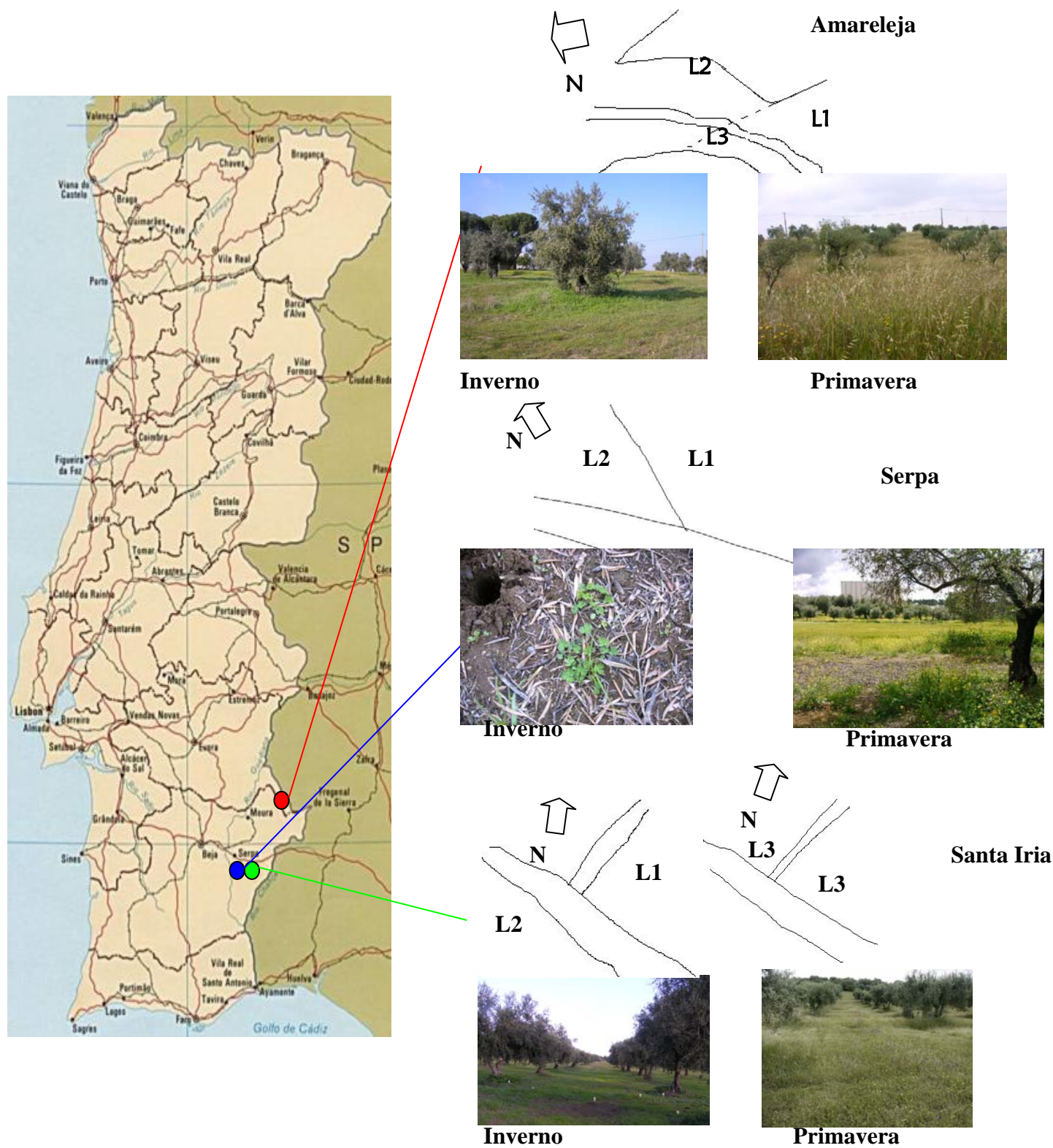


Figura 1 – Mapa de Portugal evidenciando as três localidades onde foram efectuadas as amostragens (Amareleja a vermelho, Serpa a azul e Santa Iria a verde).

Tabela I – Identificação e localização dos locais de amostragem

Localidade	Local de amostragem	Replicado	Profundidade (cm)	# Amostra (Inverno)	# Amostra (Primavera)	Latitude	Longitude	Altitude (m)	
Amareleja	L1	A1	0-25	1	39	38° 14. 116 N	007° 13. 994 W	223	
		A2	0-25	2	40	38° 14. 094 N	007° 13. 929 W	230	
			25-50	3	41			205	
		A3	0-25	4	42	38° 14. 037 N	007° 13. 915 W	227	
			25-50	5	43			202	
		A4	0-25	6	44	38° 14. 058 N	007° 13. 891 W	227	
			25-50	7	45			202	
		A5	0-25	8	46	38° 14. 038 N	007° 13. 907 W	225	
		L2	A1	0-25	9	47	38° 14. 140 N	007° 13. 930 W	232
				25-50	10	48			207
	A2		0-25	11	49	38° 14. 158 N	007° 13. 896 W	226	
			25-50	12	50			201	
	A3		0-25	13	51	38° 14. 196 N	007° 13. 913 W	217	
			25-50	14	52			192	
	A4		0-25	15	53	38° 14. 207 N	007° 13. 910 W	214	
	A5		0-25	16	54	38° 14. 219 N	007° 13. 955 W	216	
	L3 (controlo)		A1	0-25	17	55	38° 14. 117 N	007° 13. 977 W	227
				25-50	18	56			202
	A2	0-25	19	57	38° 14. 083 N	007° 13. 964 W	225		
	Serpa	L1	A1	0-25	20	58	37° 56. 910 N	007° 35. 928 W	190
A2			0-25	21	59	37° 56. 925 N	007° 35. 953 W	174	
A3			0-25	22	60	37° 56. 942 N	007° 35. 977 W	180	
A4			0-25	23	61	37° 56. 953 N	007° 36. 004 W	177	
A5			0-25	24	62	37° 56. 971 N	007° 36. 044 W	175	
L2 (controlo)		A1	0-25	25	63	37° 56. 965 N	007° 36. 053 W	174	
		A2	0-25	26	64	37° 56. 915 N	007° 35. 956 W	184	

Tabela I (cont.) – Identificação e localização dos locais de amostragem

Localidade	Local de amostragem	Replicado	Profundidade (cm)	# Amostra (Inverno)	# Amostra (Primavera)	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Santa Iria	L1	A1	0-25	27	65	37° 53. 519 N	007° 32. 422 W	174
		A2	0-25	28	66	37° 53. 535 N	007° 32. 419 W	180
		A3	0-25	29	67	37° 53. 530 N	007° 32. 374 W	181
		A4	0-25	30	68	37° 53. 486 N	007° 32. 343 W	179
		A5	0-25	31	69	37° 53. 489 N	007° 32. 384 W	178
	L2 (controlo)	A1	0-25	32	70	37° 53. 482 N	007° 32. 421 W	177
		A2	0-25	33	71	37° 53. 475 N	007° 32. 423 W	176
	L3	A1	0-25	34	72	37° 53. 797 N	007° 32. 378 W	171
		A2	0-25	35	73	37° 53. 847 N	007° 32. 377 W	180
		A3	0-25	36	74	37° 53. 844 N	007° 32. 447 W	181
		A4	0-25	37	75	37° 53. 835 N	007° 32. 334 W	175
		A5	0-25	38	76	37° 53. 794 N	007° 32. 336 W	170

Tabela II – Caracterização físico-química dos solos onde foram efectuadas as amostragens

Localidade	Amareleja (0-25cm)	Amareleja (25-50cm)	Amareleja (controlo)	Serpa	Santa Iria	Santa Iria (controlo)
Fósforo (ppm)	19	9	85	20	352	79
Potássio (ppm)	77	70	122	225	222	147
Matéria orgânica (%)	1,1	0,7	1,0	1,5	1,5	1,2
Carbono orgânico (%)	0,7	0,4	0,6	0,9	0,9	0,7
Azoto total (%)	0,09	0,08	0,12	0,12	0,13	0,13
Relação C/N	7,93	5,07	4,83	7,25	6,69	5,35
Textura	Fina	Fina	Fina	Fina	Fina	Média
pH	6,7	6,5	6,0	6,9	7,4	6,4
Condutividade eléctrica (mmohs/cm)	0.1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
Ferro (ppm)	218	202	329	380	297	213
Manganês (ppm)	94	78	123	429	361	293
Zinco (ppm)	0,8	0,6	1,9	3,2	3,6	1,6
Cobre (ppm)	4,2	2,5	3,5	10,2	9,7	8,5
Capacidade de troca	5,25	6,78	5,64	15,23	11,41	10
Grau de saturação (%)	56,0	57,1	36,2	86,9	80,7	70

ANEXO III

Soluções utilizadas

1 – Extracção de ácidos nucleicos

1.1 – Protocolo modificado a partir de Hurt *et al.* (2001):

1.1.1 – Solução desnaturante

a) Tris-HCl 200mM pH7 (50ml)

Pesaram-se 1,21g de Tris (Sigma), dissolveram-se em 50ml de água destilada e acertou-se o pH a 7 com ácido clorídrico diluído (Merck).

b) Solução desnaturante (100ml)

À solução de Tris-HCl preparada no ponto anterior (cf nos 100ml de solução desnaturante = 100mM) foram adicionados 47,21g de isotiocianato de guanidina (Sigma) (cf = 4M), 0,046g de EDTA (Sigma) (cf = 1mM) e fez-se o volume de 100ml com água destilada. Esta solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 min (Uniclave 88, ajc). Posteriormente, foram adicionados 500µl de 2-mercaptoetanol (Promega) (cf = 0,5% v/v).

Por cada alíquota de 20ml utilizada, foram adicionados 1,5g de PVP (CalBiochem).

1.1.2 – Tampão de extracção

a) Fosfato de sódio 300mM pH7 (49ml)

Pesaram-se 2,12g de dihidrogenofosfato de sódio dihidratado (Merck) e dissolveram-se em 49 ml de água destilada. Acertou-se o pH a 7 com ácido clorídrico.

b) Tris-HCl 300mM pH7 (49ml)

Pesaram-se 1,81g de Tris, dissolveram-se em 49ml de água destilada e acertou-se o pH a 7 com ácido clorídrico diluído.

c) EDTA 300mM pH8 (49ml)

Pesaram-se 5,58g de EDTA (Sigma), dissolveram-se em 49ml de água destilada e acertou-se o pH a 8 com hidróxido de sódio diluído (Panreac).

d) Tampão de extracção (150ml)

Juntaram-se as três soluções preparadas anteriormente (cf nos 150 ml = 100mM de cada uma) e dissolveram-se 13,149g de cloreto de sódio (Sigma) (cf = 1,5M) e 1,5g de CTAB (Sigma) (cf = 1% p/v) nessa solução final. Esta solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 min. Posteriormente, foram dissolvidos 3g de SDS (Bio-Rad) em 3ml de água destilada. Esta solução foi filtrada e adicionada ao restante tampão de extracção (cf = 2% p/v).

Nota: o SDS forma um complexo branco insolúvel com o CTAB, pelo que a solução deve ser aquecida a 65°C e bem agitada antes de usar.

1.1.3) clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1 (100ml)

Num frasco, na *hotte*, misturaram-se bem 96ml de clorofórmio (Merck) e 4ml de álcool isoamílico (Merck).

1.2 – Protocolo modificado a partir de Miller *et al.*(1999):

1.2.1 – Tampão de lise SDS:

a) Solução de Tris-HCl 1,5M, pH8 (50ml):

Pesaram-se 18,5g de Tris e diluíram-se em 50ml de água destilada. Seguidamente, ajustou-se o pH a 8, através da adição de ácido clorídrico diluído.

b) Solução de cloreto de sódio 1M, pH8 (50ml):

Pesaram-se 2,93g de cloreto de sódio (Sigma) e diluíram-se em 50ml de água destilada. Acertou-se o pH a 8 com ácido clorídrico.

c) Tampão lise SDS (30ml):

Juntaram-se 10 ml da solução de Tris-HCl 1,5M, pH8 (cf = 500mM), 3 ml da solução de cloreto de sódio 1M, pH8 (cf = 100mM), 3g de SDS (cf = 10% p/v) e fez-se o volume de 30ml com água destilada. A solução foi posteriormente filtrada com um filtro de 0,2µm.

1.2.2 – Tampão fostato 100mM, pH8 (50ml):

Dissolveram-se 0,6g de dihidrogenofosfato de sódio em água destilada e acertou-se o pH a 8, com ácido clorídrico. Filtrou-se com um filtro de 0,2µm.

1.3 – Protocolo GES (Pitcher *et al.*, 1989):

1.3.1 – Tampão GES

a) EDTA 500mM pH8 (20ml)

Dissolveram-se 3,72g de EDTA (Sigma) em 20 ml de água destilada e acertou-se o pH a 8 com hidróxido de sódio diluído.

b) Sarcosil 10% (p/v) (10ml)

Dissolveu-se 1g de sulfato de sarcosina-N-lauroil de sódio (Sigma) em 10ml de água destilada, agitando bem.

Nota: é preferível o uso de sarcosina-N-lauroil de sódio em vez de sulfato lauril de sódio, uma vez que o primeiro não precipita com o SDS.

c) Tampão GES (100ml)

Dissolveram-se 60g de tiocianato de guanidina (Sigma) (cf = 5M) na solução de EDTA preparada no ponto a) (cf = 100mM) com mais 20 ml de água destilada, com agitação, a 65°C. Deixou-se esta solução arrefecer até à temperatura ambiente e adicionaram-se os 10 ml de sarcosil 10% (p/v) preparados no ponto b). Misturou-se bem e fez-se o volume de 100ml com água destilada. Esterilizou-se por filtração com um filtro de 0,45 µm.

1.3.2 – Tampão de lise

a) Tris-HCl 1M, pH9 (10ml)

Dissolveram-se 0,12g de Tris em 10 ml de água destilada e acertou-se o pH a 9 com ácido clorídrico diluído.

b) cloreto de potássio 1M (10ml)

Dissolveram-se 0,745g de cloreto de potássio em 10 ml de água destilada.

c) Tampão de lise (100ml)

Juntaram-se 1ml do tampão Tris-HCl preparado no ponto a) (cf = 10mM), 5 ml de cloreto de potássio 1M (50mM), 100µl de Triton-X (cf = 0,001% v/v) e perfez-se o volume de 100ml com água destilada. Agitou-se e autoclavou-se por 15min. a 121°C.

1.3.3 – Lisozima 10mg/ml (10ml)

Dissolveram-se 100mg de lisozima (Sigma) em 10ml de água miliQ estéril e fizeram-se alíquotas de 500µl, para a enzima não perder a actividade com sucessivos congelamentos e descongelamentos.

1.3.4 – Acetato de amónia 10M (10ml)

Dissolveram-se 7,78g de acetato de amónia (Merck) em 10 ml de água destilada. Agitou-se a autoclavou-se a 121°C, durante 15min.

1.4 – Electroforese (Sambrook *et al.*, 1989)

1.4.1 – TAE 50x:

a) EDTA 500mM, pH8 (50ml):

Dissolveram-se 9,3g de EDTA em 50 ml de água destilada e acertou-se o pH a 8 com hidróxido de sódio diluído.

b) TAE 50x (500ml)

Num frasco, adicionaram-se 121g de Tris (cf = 2M), 28,55 ml de ácido acético glacial (cf = 5,71% v/v) e 50 ml de EDTA 500mM, pH8 (cf = 50mM). Perfez-se o volume de 500 ml com água destilada.

1.4.2 – Gel de agarose 1% e 2% (p/v) (300ml)

Dissolveram-se 3 ou 6g de agarose (Sigma), respectivamente para um gel de 1% ou 2% (p/v), numa solução de TAE 1x (6ml de TAE 50x em 294 ml de água destilada) muito lentamente e com agitação manual, para evitar a formação de aglomerados difíceis de dissolver. Ferveu-se no microondas até a solução ficar límpida e a agarose completamente dissolvida.

1.4.3 – Tampão de aplicação para DNA e ácidos nucleicos totais (10ml):

Para um copo de vidro pesaram-se 25mg de azul de bromofenol (Promega) (cf = 0,25% p/v), 2,5g de ficol tipo 400 (Promega) (cf = 25% p/v), perfez-se o volume de 10ml com água destilada, adicionaram-se 10 μ l de RNaseA (USB) a 10mg/ml (cf = 10 μ g/ml) e homogeneizou-se bem numa placa de agitação magnetizada.

1.4.4 – Gel desnaturante para RNA

Prepararam-se 47 ml de gel de agarose 1% (p/v) em TAE1x, conforme descrito no ponto 1.4.3., aos quais se adicionaram 3ml de formaldeído (Merck) a 37% (v/v) e 2,5 μ l de *Sybr DNA Safe* (Invitrogen).

1.4.5 – Tampão de amostra para RNA

1.4.5.1 – MOPS 5x

a) EDTA 500mM (10ml)

Dissolveram-se 1,86g de EDTA em 10 ml de água/DEPC.

b) MOPS 5x (100ml)

Dissolveram-se 4,186g de MOPS (Merck) (cf = 200mM) e 0,4115g de acetato de sódio (cf = 50mM) em 80ml de água/DEPC. Adicionou-se 1ml da solução de EDTA 500mM (cf = 5mM) e ajustou-se o pH a 7 com hidróxido de sódio. Perfez-se o volume de 100 ml com água/DEPC e fizeram-se alíquotas de 20ml, que foram autoclavadas e posteriormente armazenadas a -20°C.

1.4.5.2 – Tampão de amostra para RNA (17µl)

Para cada amostra preparou-se uma mistura de 3µl de formaldeído, 10µl de formamida (Merck) e 4µl de MOPS 5x.

1.4.6 – Tampão de aplicação para RNA (5ml)

Dissolveram-se 1,9mg de EDTA (cf = 1mM) e 20mg de azul de bromofenol (cf = 0.4% p/v) em 2,13ml de água/DEPC e adicionaram-se 2,87ml de glicerol estéril a 87% (v/v) (Panreac) (cf = 50% v/v). Fizeram-se alíquotas de 20µl e armazenaram-se a -20°C.

2 – Meios de cultura

2.1 – LB (*Luria Broth*) (250ml)

Dissolveram-se 3,875g de meio LB (Sigma) em água destilada (cf = 15,5g/l) e autoclavou-se a 121°C, durante 15 min. Para fazer o mesmo meio em placa (sólido), procedeu-se de igual forma, tendo sido adicionados também 3,75g de agar (Liofilchem) (cf = 15g/l).

Para preparar placas de LB com ampicilina (Sigma) (cf = 100µg/µl), deixou-se o meio arrefecer até ~45°C e adicionam-se 500µl de ampicilina (50mg/ml) a 250ml de meio.

2.2 – Meio para *Azotobacter* (1000ml) (Holt e Krieg, 1994)

Em 950ml de água destilada dissolveram-se 0,1g de cloreto de cálcio dihidratado (Sigma), 0,1g de sulfato de magnésio heptahidratado (Merck), 5mg de molibdato de sódio dihidratado (Sigma), 0,9g de hidrogenofosfato de potássio (Merck), 0,1g de dihidrogenofosfato de potássio (Panreac), 0,01g de sulfato de ferro heptahidratado (Merck), 0,5g de carbonato de cálcio (Merck) e 15g de agar (Liofilchem). Ajustou-se o pH a 7,3 e autoclavou-se a 121°C, durante 15min. À parte, em 50 ml de

água destilada, dissolveram-se 5g de glucose (Fisher Scientific) e 5g de manitol (AnalaR), que foram esterilizados por filtração (0,2µm) e posteriormente adicionados ao restante meio.

Para o meio líquido, não se adicionou o agar.

2.3 – Meio manitol-levedura (1000ml) (Holt e Krieg, 1994)

Em 950ml de água destilada colocaram-se 0,5g de extracto de levedura (Difco), 0,5g de hidrogenofostato de potássio (Merck), 0,1g de cloreto de sódio (Sigma), 0,2g de sulfato de magnésio (Merck), 0,3g de carbonato de cálcio (Merck) e 15g de agar (Liofilchem) e autoclavou-se a 121°C, durante 15 min. À parte, dissolveram-se em 47,5 ml de água destilada 10g de manitol (AnalaR) e 100 mg de ciclohexamida (Sigma) (cf = 100 µg/ml), adicionando também 2,5ml de vermelho do Congo (Merck) a 1% (p/v) e filtrou-se por um filtro de 0,2µm. Depois de autoclavar e arrefecer até ~40°C, juntou-se a solução filtrada à autoclavada e distribuiu-se o meio por placas.

Nota: tanto este meio como o anterior não foram muito utilizados na forma líquida (sem agar), uma vez que precipitam, não só retirando os nutrientes de solução, como tornando difícil a observação de turvação indicadora do crescimento bacteriano, bem como o *pellet* no fundo do tubo.

3 – Clonagem (Sambrook *et al.*, 1989)

3.1 – Tampão de cloreto de cálcio (100ml):

Para 100 ml, dissolveram-se 0,061g de Tris em 50 ml de água destilada e acertou-se o pH a 7,5 com ácido clorídrico diluído (cf = 5mM). A esta solução juntaram-se 30 ml de glicerol 50% (p/v) (cf = 15%), 0,048g de cloreto de magnésio (Sigma) dissolvidos em 5ml de água destilada (cf = 5mM) e 1,11g de cloreto de cálcio (Sigma) dissolvido em 15ml de água destilada (cf = 100mM). A solução foi filtrada com um filtro de 0,2µm.

3.2 – Meio SOC

a) – Meio SOB (100ml)

Dissolveram-se em 100 ml de água destilada 2g de bacto-triptona (Difco), 0,5g de extracto de levedura (Difco), 0,0584g de cloreto de sódio (Sigma) e 0,0186g de cloreto de potássio (Merck). Ajustou-se o pH a 7 com hidróxido de sódio diluído e autoclavou-se durante 15min. a 121°C.

b) – Solução de sais de magnésio 2M (100ml)

Em 100 ml de água destilada dissolveram-se 20,33g de cloreto de magnésio (Sigma) e 24,65g de sulfato de magnésio heptahidratado (Merck). Autoclavou-se durante 15min. a 121°C.

c) – Solução de glucose 2M (100ml)

Dissolveram-se 36,04g de glucose (Fisher Scientific) em 100ml de água destilada e filtrou-se com um filtro de 0,2µm.

d) – Meio SOC (100ml)

Juntaram-se 1ml da solução de sais de magnésio a 2M (cf = 20mM), 1ml da solução de glucose a 2M (cf = 20mM) e 98ml de meio SOB. Homogeneizou-se bem e congelaram-se alíquotas de 1ml.

4 – Lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989)

4.1 – Tampão GTE

a) – EDTA 500mM, pH8 (10ml)

Dissolveram-se 1,86g de EDTA em 10 ml de água destilada e acertou-se o pH a 8 com hidróxido de sódio diluído.

b) – Tris 1M, pH8 (10ml)

Dissolveram-se 0,12g de Tris em 10 ml de água destilada e acertou-se o pH a 8 com ácido clorídrico diluído.

c) – Tampão GTE (100ml)

Juntaram-se 1g de glucose monohidratada (cf = 50mM), 2,5ml de Tris 1M pH8 (cf = 25mM) e 2ml de EDTA 500mM pH8 (cf = 10mM). Perfez-se o volume de 100ml com água destilada e autoclavou-se a 121°C, durante 15min.

4.2 – Rnase A 10mg/ml (10ml)

Dissolveram-se 100mg de RNase A (USB) em 10 ml de água destilada e fizeram-se alíquotas, que foram armazenadas a -20°C.

4.3 – NaOH 2M (10ml)

Dissolveram-se 0,8g de hidróxido de sódio (Panreac) em 10ml de água destilada. Autoclavou-se durante 15 min. a 121°C.

4.4 – SDS 10% (p/v) (10ml)

Dissolveu-se 1g de SDS em 10ml de água destilada e filtrou-se por um filtro de 0,2µm.

4.5 – Acetato de sódio 3M pH5.2 (20ml)

Dissolveram-se 2,72g de acetato de sódio (Merck) em 20 ml de água destilada e ajustou-se o pH a 5,2 com ácido acético glacial. Autoclavou-se durante 15 min. a 121°C e posteriormente armazenou-se a 4°C.

Nota: a solução resultante, devido à adição de ácido acético glacial, tem 3M de potássio e 5M de acetato.

5 – Electroforese em gradiente térmico (TGGE) (Etscheid e Riesner, 1998; Cairns e Murray, 1994)

5.1 – Gel de acrilamida 6% (p/v)

a) – Perssulfato de amónia 10% (p/v)

Dissolveu-se 1g de perssulfato de amónia em 10ml de água, dividiu-se em alíquotas e armazenou-se a -20°C.

b) – Acrilamida/bisacrilamida (37:1) 6% (p/v) (50ml)

Juntaram-se 2,895g de acrilamida (Promega), 0,165g de bisacrilamida (Promega), de 11,5ml de glicerol 87% (v/v) (cf = 20% v/v), 21g de ureia (Amersham Biosciences) (cf = 7M), 10ml de

formamida (cf = 20% v/v) e fez-se o volume de 50ml com água destilada. Homogeneizou-se e autoclavou-se durante 15 min. a 121°C. Depois, antes da polimerização, juntaram-se 110µl de TEMED (Bio-Rad) e 80µl de persulfato de amónia 10% (p/v) (Bio-Rad).

5.2 – Tampão de aplicação (10ml)

Pesaram-se 1mg de azul de bromofenol (cf = 0.01% p/v), 7,4mg de EDTA (cf = 2mM) e fez-se o volume de 10 ml com TAE1x. Agitou-se. Adicionaram-se 10µl de Triton-X 100 (cf = 0,1% v/v), homogeneizou-se e fizeram-se alíquotas para armazenar a 4°C.

5.3 – Coloração com nitrato de prata

Foram preparados 400ml de cada solução:

- a) Etanol 10% (v/v): foram adicionados 40ml de etanol 100% (v/v) a 360ml de água MilliQ
- b) Ácido nítrico 0,15% (v/v): foram adicionados 920µl de ácido nítrico 65% (v/v) (Merck) a 399 ml de água MilliQ
- c) Nitrato de prata 0,202% (v/v): foram adicionados 60ml de uma solução concentrada de nitrato de prata (0.1M) (Merck) a 340 ml de água MilliQ.

Nota: esta solução é preparada na hora de utilizar.

- d) Carbonato de sódio 3% (p/v): foram adicionadas 12g de carbonato de sódio (Merck) a 400ml de água MilliQ

Nota 1: esta solução deve ser pré-aquecida num banho a 50°C, para aumentar a sua eficiência

Nota 2: imediatamente antes de utilizar, devem ser adicionados a esta solução 300µl de formaldeído

- e) Ácido acético 10% (v/v): foram adicionados 40ml de ácido acético glacial (Quimex) a 360ml de água MilliQ