



**Debbie Eldridge**

Ciência e Plantas para as Escolas, Colégio Homerton  
Hills Road, Cambridge CB2 8PH UK

# Algas imobilizadas

## Estudo da fotossíntese usando algas imobilizadas

### Objectivo

Estimular os alunos para o estudo quantitativo da fotossíntese

### Introdução

As experiências mais comuns sobre fotossíntese incluem o estudo da variação da concentração de oxigénio usando Elódea (*Elodea canadensis*) ou o teste do amido em folhas de *Pelargonium* descoradas. Ambos os métodos são de quantificação difícil e o segundo método muitas vezes induz os alunos em erro.

Neste processo, as algas, imobilizadas em alginato de cálcio, oferecem uma quantidade uniformizada de material fotossintético, permitindo a execução de experiências semi-quantitativas. A taxa de absorção de dióxido de carbono pelas células imobilizadas é utilizada para calcular a taxa da fotossíntese — tal pode ser simplesmente feito através da observação da alteração da cor do indicador de hidrogenocarbonato, a olho ou utilizando um colorímetro. Pode-se estudar o efeito da variação da intensidade ou comprimento da onda da luz, bem como o efeito da temperatura ou a densidade da célula. Também podem ser testadas diferentes espécies de algas ou de cianobactérias.



*A Scenedesmus quadricauda, uma alga que cresce em conjuntos de quatro células, é a ideal para esta experiência.*

## Equipamento e materiais

### Necessários para cada pessoa ou grupo

#### Equipamento

- Seringa de plástico (sem agulha) com 10 mL
- 2 copos pequenos ou copos de plástico descartáveis
- Proveta de 100 mL
- Filtro de chá
- Vareta de vidro ou um pequeno misturador de plástico
- 8 minifrascos de 5–7 mL, com tampas
- Lâmpada
- Régua
- Acesso a um colorímetro ou a um conjunto de soluções padrão (ver detalhes abaixo)
- OPCIONAL: Para investigar o efeito do comprimento da onda da luz, filtros coloridos (ver Fornecedores)

#### Materiais

- 3% de solução de alginato de sódio, 3 mL
- 2% de solução de cloreto de cálcio, 100 mL
- 50 mL de suspensão de algas, por exemplo, *Scenedesmus quadricauda* (concentrado de 3 mL)
- ~45 mL de solução indicadora de hidrogenocarbonato

### Necessários por turma

#### Indicador de hidrogenocarbonato

##### 1 litro de solução padrão 10x

- Vermelho de cresol, 0,1g
- Azul de timol, 0,2g
- Hidrogenocarbonato de sódio (bicarbonato de sódio,  $\text{NaHCO}_3$ ), 0,85g
- Álcool etílico, 20 mL
- Água destilada fervida na altura, ~1L

- 1 Dissolver 0,1g de vermelho de cresol e 0,20g de azul de timol em 20 mL de álcool etílico.
- 2 Dissolver 0,85g de hidrogenocarbonato de sódio em ~200 mL de água destilada (e, portanto sem  $\text{CO}_2$ ) fervida na altura.
- 3 Adicionar a solução etanólica de vermelho de cresol e azul de timol e diluir em 1L de água destilada fervida na altura.

*Para utilizar, dilua esta solução padrão com nove volumes de água destilada fervida na altura e ajuste o pH para ~7.4. Idealmente, esta solução deve ser totalmente arejada antes da utilização para que seja vermelho vivo.*

#### Nota

*O indicador de hidrogenocarbonato é muito sensível às variações de pH, sendo por isso essencial que todo o material seja enxaguado com um pouco de indicador antes da utilização.*



## Para preparar um conjunto de soluções padrão

Se não tiver à sua disposição um colorímetro, a alteração da cor do indicador pode ser semi-quantificada através da sua comparação com uma série de soluções tampão coloridas. Pode-se efectuar soluções de pH 7,6 a 9,2 utilizando uma solução tampão de ácido bórico e borato de sódio.

- 9 frasquinhos de vidro de 10 mL com tampa
  - 12,4 g de ácido bórico
  - 19,5 g de borato de sódio (Borax,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )
  - 9 mL de solução indicadora de hidrogenocarbonato
- 1 Dissolver o ácido bórico num litro de água destilada ou água desionizada.
  - 2 Dissolver o borato de sódio num litro de água destilada ou água desionizada.
  - 3 Para 25 mL da solução de ácido bórico, adicione o volume de borato de sódio indicado no quadro, compensando com água destilada ou água desionizada até perfazer 100 mL.
  - 4 Coloque 9 mL de cada uma das soluções preparadas em cada um dos frasquinhos.
  - 5 Imediatamente antes da aula, adicione 1 mL da solução concentrada indicadora de hidrogenocarbonato em cada frasquinho. Os alunos podem comparar os seus resultados através das cores nos tubos.

Solução de bórax, mL	pH
1.00	7.6
1.55	7.8
2.45	8.0
3.60	8.2
5.70	8.4
8.70	8.6
15.00	8.8
29.50	9.0
57.50	9.2

## Para cultivar as algas

- Garrafa de plástico de sumo de 2 litros
  - Bomba de ar de aquário
  - Tubagem de ar do aquário e pedra porosa ou aspersor de vidro
  - Algodão ou espuma, de preferência não absorvente, para tapar a parte de cima da garrafa
  - 2 Lâmpadas de temperatura baixa, ex. lâmpadas de 18W de poupança de energia (equivalente a 100W),
  - 1L de meio de enriquecimento de algas (consultar o item Fornecedores)
- 1 Adicione 1,5 g de meio de enriquecimento a 1 litro de água destilada numa garrafa de refrigerante de 2 litros e abane para dissolver. Irá assentar algum pó residual. Isto é normal e será utilizado pelas algas à medida que os nutrientes solúveis são reduzidos.
  - 2 Inocule a garrafa com as algas.
  - 3 Insira a linha de ar para arejar a cultura com a bomba de ar. Isto irá fornecer mais dióxido de carbono dissolvido e irá manter as algas a circularem.
  - 4 Tape a garrafa com uma rolha de algodão ou de espuma. Ilumine continuamente a cultura com uma luz brilhante enquanto esta se desenvolve. Para bons resultados utilize pequenas luzes fluorescentes ou lâmpadas de 18W de baixa energia. Os melhores resultados são obtidos quando a luz exterior do laboratório é minimizada.



**AVISO!** Não coloque as lâmpadas quentes perto da cultura. Consulte as Directrizes de segurança.

## Procedimento

- 1 Prepare uma suspensão concentrada de algas. Existem duas formas para o fazer:
- 2 Deixar a suspensão de algas verdes escuras de 50 mL repousar (idealmente, de um dia para outro) e, depois, separar o líquido sobrenadante de modo a deixar cerca de 3 mL de concentrado.  
*Ou*  
Centrifugar 50 mL da suspensão a baixa velocidade durante 5 minutos. Separe o líquido sobrenadante limpo de modo a deixar cerca de 3 mL de concentrado.
- 2 Deite ~3 mL da suspensão de algas num pequeno copo e adicione uma quantidade igual da solução de alginato de sódio. Mexa cuidadosamente até que as algas fiquem distribuídas igualmente.
- 3 Extraia para uma seringa a suspensão de algas/alginato.

Fig. 1

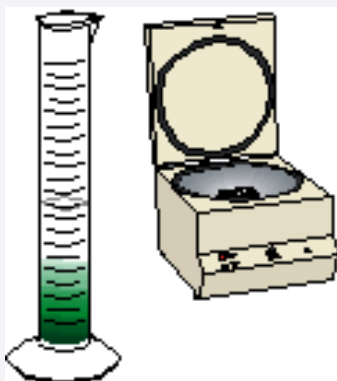


Fig. 2

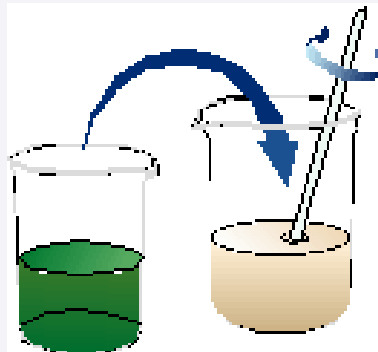


Fig. 3



- 4 Coloque por debaixo da seringa um copo com a solução de cloreto de cálcio e permita que a mistura de algas/alginato pingue vagarosamente da ponta da seringa para o líquido. Ao mesmo tempo mexa com cuidado a solução de cloreto de cálcio.
- 5 Deixe os aglomerados de algas imobilizadas endurecerem na solução de cloreto de cálcio durante 5–10 minutos. As moléculas do alginato serão interligadas com os iões de cálcio, encurralando as células numa matriz de alginato de cálcio.
- 6 Separe os aglomerados da solução de cloreto de cálcio utilizando o filtro de chá, e lave os aglomerados cuidadosamente com água fria da torneira. No final, lave os ensaios com água destilada. Se foram iluminados e se lhes for impedido que sequem, os ensaios serão conservados durante várias semanas. Em alternativa, podem ser guardados em água destilada num frigorífico durante vários meses. Após retirar os aglomerados do frigorífico, deve permitir que aqueçam durante 30 minutos.

Fig. 4



Fig. 5

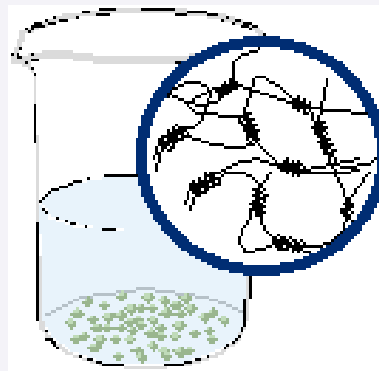


Fig. 6



- 7 Lave várias garrafas pequenas com uma pequena porção de solução indicadora de hidrogenocarbonato.
- 8 Adicione o mesmo número de aglomerados a cada garrafa e adicione um volume padrão e calculado da solução indicadora de hidrogenocarbonato. Substitua a tampa de cada garrafa. Serão necessários cerca de 12–15 ensaios para cada tubo.
- 9 Coloque os recipientes a diferentes intensidades de luz posicionando-os a diferentes distâncias da luz. Deixe-os 1–2 horas até que o indicador, em alguns dos recipientes, mude de cor.

Fig. 7



Fig. 8

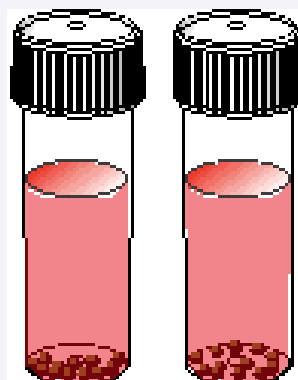


Fig. 9



- 10 Determine a concentração relativa de dióxido de carbono presente em cada tubo com os aglomerados de algas. Existem duas formas para o fazer:

Faça corresponder o indicador de hidrogenocarbonato presente nos tubos com os aglomerados de algas com um conjunto de soluções padrão;

*Ou*

utilize um colorímetro para calcular a absorção das soluções a 550 nm (ou seja, com o filtro verde). Nota: É importante calcular a absorção (não a transmissão) nestes ensaios, já que há uma resposta linear entre a absorção e o pH do indicador, no intervalo estudado.

- 11 Desenhe um gráfico de modo a indicar a absorção a 550 nm, ou o pH do indicador de hidrogenocarbonato em relação à intensidade de luz relativa, ou seja,  $1/(distância^2)$ .

Fig. 10a



Fig. 10b

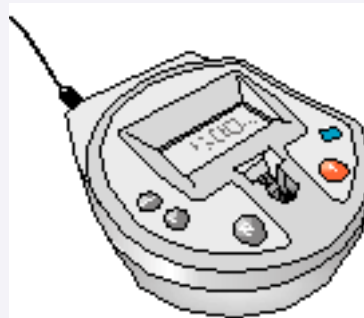
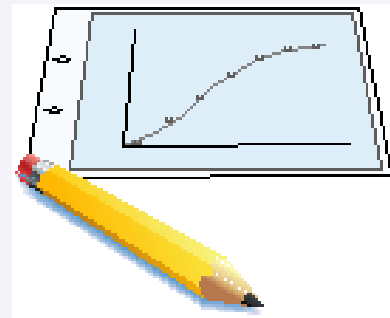


Fig. 11



## Directrizes de segurança

### Cultivar as algas

A concentração de gás dentro de um recipiente de cultura, em particular um de vidro, pode ser perigoso. Consequentemente, deve certificar-se que o recipiente utilizado para cultivar as algas é adequadamente arejado.

Deve ter-se cuidado de modo a garantir que as luzes utilizadas para iluminar a cultura e a bomba do aquário não entram em contacto com o líquido caso derrame ou vaze do recipiente da cultura. Portanto, aconselha-se que o recipiente da cultura seja colocado num tabuleiro fundo com a capacidade suficiente para conter o líquido no caso de ocorrer um derrame. Todo o equipamento eléctrico deve ser colocado fora do tabuleiro.

### Químicos

Nenhum dos químicos utilizados neste protocolo é considerado prejudicial se usado segundo as indicações deste protocolo..

### Lâmpadas

Quando utilizar lâmpadas para iluminar as algas, deve ter cuidado para se certificar que não são utilizadas de forma a que haja risco de choque eléctrico ou sobreaquecimento que possa causar queimaduras ou incêndio.



## Preparação e tempo

### Cultivar as algas

As algas devem ser cultivadas durante 3-4 semanas e, antes da aula, deve-se deixar a cultura repousar uma noite para sedimentar.

### Solução de alginato de sódio

O alginato de sódio leva algum tempo para ser dissolvido, portanto a solução deve ser idealmente preparada no dia anterior à aula. Permite-se assim que o alginato se dissolva durante a noite, de preferência num agitador magnético. Podem preparar-se grandes quantidades num misturador. Tome em consideração que o excesso de calor pode reduzir a força do alginato devido à despolimerização. Caso pretenda guardar a solução de alginato de sódio durante alguns dias, é aconselhável que a submeta ao autoclave. Contudo, de modo a evitar a despolimerização excessiva do alginato, deve aumentar o pH para 7–8 antes de o autoclavar.

### O protocolo prático

As algas imobilizadas podem ser preparadas pelos alunos em 15–20 minutos. A preparação da experiência demora mais 20–30 minutos e 1–2 horas para o indicador mudar de cor.

## Resolução de problemas

Já que é difícil dissolver o alginato de sódio, pode ser útil deixá-lo dissolver de um dia para outro. Se pretende experimentar actividades adicionais utilizando as soluções tampão, tome em consideração que se deve evitar tudo o que tenha fosfato, citrato ou EDTA, já que pode causar a dissolução da matriz de alginato. Caso pretenda recuperar as algas dos ensaios de alginato, pode utilizar um tampão de 50 mM de citrato de sódio ou um tampão de fosfato com pH 7 para dissolver o gel de alginato de cálcio.

## Experiências adicionais

O procedimento fundamental descrito anteriormente pode ser explorado/continuado de variadas formas. Os exemplos de investigações possíveis incluem:

### 1 Intensidade da luz

Isto pode ser conseguido através de duas formas: variar a distância da lâmpada ou cobrir os recipientes com filtros de densidade neutra (ver Fornecedores).

### 2 Comprimento de onda da luz

Utilize filtros coloridos, enrolados à volta de cada minifrasco e isolados com fita no canto mais longe da fonte de luz. Para os alunos analisarem bem os resultados têm de saber que diferentes fontes de luz produzem luz com comprimentos de onda diferentes e vão precisar de saber quais os comprimentos de onda de luz que são transmitidos por cada um dos filtros.

### 3 Temperatura

Prepare banhos de água por debaixo de um conjunto de luzes e ponha os recipientes selados a flutuar na água com a luz a brilhar por cima.

**4 Número de células de algas**

Prepare vários conjuntos de ensaios de algas com diferentes números de algas. Tal pode ser conseguido agitando inicialmente a cultura, e depois usando diferentes volumes dessa cultura para obter o sedimento.

**Outras fontes de informação**

Eldridge, D. (2004) A novel approach to photosynthesis practicals. *School Science Review* 85 (312) 37–45..

*Este artigo descreve as experiências que foram executadas com as algas imobilizadas com maior detalhe.*

Smidsrød, O. and Skjåk-Bræk, G. (1990) Alginate as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8 (3) 71–78.

**Science and plants for schools**

Pode encontrar a versão original deste protocolo em:

[www.saps.plantsci.cam.ac.uk/worksheets/ssheets/ssheet23.htm](http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/worksheets/ssheets/ssheet23.htm)

Para mais informações acerca da absorção e filtros de luz:

[www.saps.plantsci.cam.ac.uk/articles/broad\\_light.htm](http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/articles/broad_light.htm)

**Fornecedores****Alginato de sódio**

É possível comprá-lo através dos fornecedores químicos da escola.

Também é utilizado na produção de comida, por isso também pode ser disponibilizado a partir de fontes da indústria alimentar, apesar da viscosidade das preparações variar e, portanto, poder ser necessário alguma experimentação.

**Colorímetro**

Um colorímetro recomendado é o modelo CO7500 da Biochrom Ltd, 22 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0FJ, UK. W: [www.biochrom.co.uk](http://www.biochrom.co.uk). Este colorímetro tem um visor digital, é de utilização simples e os resultados são fiáveis.

**Filtros**

Filtros coloridos e de densidade neutra para estudar os efeitos dos diferentes comprimentos de onda ou intensidade luminosa podem ser obtidos em lojas de material fotográfico.

**Algas**

*Scenedesmus quadricauda* e outras algas estão disponíveis na Sciento nos fornecedores de material de laboratório ou em Universidades.

**Filtros coloridos**

Cor	Código
Âmbar Escuro	(104)
Vermelho Primário	(106)
Azul Escuro	(119)
Verde Escuro	(124)
Verde Primário	(139)
Vermelho Claro	(182)
Violeta	(344)
Azul Claro	(722)

**Filtros de densidade neutra**

Cor	Código
0.15 ND	(298)
0.3 ND	(209)
0.6 ND	(210)
0.9 ND	(211)
1.2 ND	(299)



## Agradecimentos



Este protocolo prático foi desenvolvido por Debbie Eldridge da King Ecgbert School, Sheffield através da atribuição de uma Bolsa Universitária para Professores financiada pela Science and Plants for Schools (SAPS) e pelo Robinson College, Cambridge. A SAPS é financiada pela Gatsby Charitable Foundation.

Este protocolo prático foi adaptado para o projecto Volvox, financiado ao abrigo do Programa Sixth Framework da Comissão Europeia.