

***Desenvolvimento de Protocolos e Materiais Didáticos para o  
ensino da Biotecnologia Marinha nos PALOP***

**Paulino Victor Pereira**

***Desenvolvimento de Protocolos e Materiais Didáticos para o  
ensino da Biotecnologia Marinha nos PALOP***

**Paulino Victor Pereira**

Projeto para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Projeto de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Clélia Paulete Correia Neves Afonso e da Doutora Teresa Margarida Lopes da Silva Mougá

Título: Desenvolvimento de Protocolos e Materiais Didáticos para o ensino da Biotecnologia Marinha nos PALOP

Copyright © Paulino Victor Pereira

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2025

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# Dedicatória

---

Dedico este projeto à minha família, em reconhecimento ao apoio constante e ao amor incondicional que sempre me proporcionaram ao longo desta jornada acadêmica.

# Agradecimentos

---

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder tantas graças no campo acadêmico, por reconhecer em mim uma luz enviada à Terra com a missão de formar pessoas. Sou grato por ter me permitido desenvolver este projeto com o propósito de capacitar professores com ferramentas simples, que ofereçam aos alunos experiências científicas relevantes e acessíveis, promovendo, ao mesmo tempo, a compreensão aprofundada de conceitos em biologia, biotecnologia, conservação e valorização dos recursos marinhos.

Reconheço a profunda importância da minha família em todas as minhas conquistas, em especial: minha mãe, Teresa Gomes; meu irmão, Alvaro Victor Pereira; meu tio, Agostinho Mendes Pereira; minha irmã, Aisselene Victor Pereira; meus filhos, Victor Paulino Pereira e Aisselene Paulino Pereira; e minha esposa, Cecília Vicente Datchuplam, por trazer leveza, felicidade e amor à minha vida. Minha eterna gratidão a todos vocês, que são a base da minha existência. Obrigado pelo amor e carinho incondicionais em todos os ciclos da minha vida.

Agradeço imensamente à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clélia Neves Afonso, e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresa Lopes da Silva Mougá, minhas orientadoras, pelo apoio incondicional, amor, carinho, paciência e compreensão diante das minhas limitações ao longo do desenvolvimento deste projeto. Sou grato também pela oportunidade de aplicar a Biotecnologia em benefício da sociedade e pelo incentivo constante à minha formação como estudante e pesquisador.

Meus sinceros agradecimentos aos colegas de turma Luan Lucena Alves, Afonso Silva e Margarida Matias, que me apoiaram durante o curso. Estendo minha profunda gratidão aos professores do Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos, por contribuírem significativamente para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

# Resumo

---

O ensino de Ciências baseado em práticas experimentais enfrenta desafios significativos nos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP), como a escassez de laboratórios, de materiais didáticos e a limitada formação de professores. Apesar dessas limitações, é possível implementar um ensino mais prático e participativo por meio de abordagens criativas e do uso de recursos acessíveis. Experiências desenvolvidas em Moçambique, Cabo Verde, Angola e Guiné-Bissau revelam diferentes graus de aplicação desse modelo e obstáculos específicos em cada contexto nacional. As metodologias ativas, que colocam o estudante no centro do processo de aprendizagem, contribuem para o desenvolvimento do pensamento crítico, da autonomia e da construção do conhecimento, com o docente atuando como facilitador. A biotecnologia, particularmente a sua vertente marinha, embora detenha grande potencial científico, económico e ambiental, ainda é pouco explorada nos currículos do ensino secundário dos PALOP. Com o objetivo de inserir essa temática de forma contextualizada e viável, foram desenvolvidos protocolos laboratoriais simples, pedagógicos e de baixo custo, baseados em recursos naturais locais e práticas sustentáveis. Foram desenvolvidos trabalhos práticos sobre a extração de DNA a partir de furtos tropicais, sobre o estudo dos fatores físicos e químicos que afetam a integridade da membrana plasmática em células de beringela, e sobre a utilização das antocianinas extraídas da casca de beringela, para a obtenção de uma escala de pH. Foi também criado um protocolo para a análise de dureza e resistência à acidificação de conchas marinhas e outro para a extração e separação de pigmentos fotossintéticos de cianobactérias e macroalgas marinhas. Finalmente foi desenvolvido um protocolo para a avaliação da capacidade de biorremediação do mexilhão em águas de purga de uma aquacultura de corvina. Tais atividades buscaram não apenas apoiar professores e escolas, mas também estimular o interesse dos estudantes pelas ciências, promover o aproveitamento dos ecossistemas marinhos e contribuir para o desenvolvimento sustentável das comunidades. Este trabalho configura-se como uma contribuição relevante para a qualificação do ensino de Ciências nos PALOP, ao propor práticas pedagógicas inovadoras, inclusivas e adaptadas às realidades locais.

**Palavras-chave:** ensino de Ciências, biotecnologia marinha, metodologias ativas, PALOP, práticas experimentais.

# Abstract

---

Science education based on experimental practices faces significant challenges in Portuguese-speaking African countries (PALOP), such as the lack of laboratories, teaching materials, and limited teacher training. Despite these constraints, it is possible to implement a more practical and participatory approach through creative strategies and the use of accessible resources. Experiences developed in Mozambique, Cape Verde, Angola, and Guinea-Bissau reveal varying degrees of implementation of this model and specific obstacles within each national context. Active learning methodologies, which place the student at the center of the learning process, foster the development of critical thinking, autonomy, and knowledge construction, with the teacher acting as a facilitator. Marine biotechnology, although it holds great scientific, economic, and environmental potential, remains underexplored in the secondary school curricula of the PALOP. With the aim of introducing this subject in a contextualised and viable way, simple, pedagogical and low-cost laboratory protocols were developed, based on local natural resources and sustainable practices. Practical work was carried out on extracting DNA from tropical fruits, studying the physical and chemical factors that affect the integrity of the plasma membrane in aubergine cells, and using anthocyanins extracted from aubergine peel to produce a pH scale. A protocol was also created for analysing the hardness and resistance to acidification of marine shells and another for extracting and separating photosynthetic pigments from cyanobacteria and marine macroalgae. Finally, a protocol was developed to assess the bioremediation capacity of mussels in purge water from a corvina aquaculture. These activities aim not only to support teachers and schools but also to stimulate students' interest in science, promote the use of marine ecosystems, and contribute to the sustainable development of communities. This work represents a relevant contribution to improving science education in the PALOP, by proposing innovative, inclusive, and locally adapted teaching practices.

**Keywords:** science education, marine biotechnology, active learning methodologies, PALOP, experimental practices.

# Índice Geral

---

Dedicatória .....	i
Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Índice Geral .....	iv
Lista de Figuras .....	v
Lista de Tabelas .....	vii
Lista de Siglas.....	viii
1 - ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....	1
2 – PROTOCOLO PRÁTICO I - EXTRAÇÃO DE ADN DE FRUTOS TROPICAIS .....	10
3 – PROTOCOLO PRÁTICO II - FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS QUE AFETAM A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM CELULAS DE BERINGELA .....	19
4 – PROTOCOLO PRÁTICO III – AS ANTOCIANINAS COMO INDICADOR DE pH .....	32
5 – PROTOCOLO IV - ANÁLISE DE DUREZA E RESISTÊNCIA À ACIDIFICAÇÃO DE CONCHAS MARINHAS .....	44
6 – PROTOCOLO V - EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS DE CIANOACTÉRIAS E MACROALGAS MARINHAS .....	55
7 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL VI - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIORREMEDIAÇÃO DO MEXILHÃO EM ÁGUAS DE PURGA DE UMA AQUACULTURA DE CORVINA.....	69
8 - CONCLUSÃO .....	88
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89

---

# Lista de Figuras

---

Figura 2.1.: Alguns dos materiais usados na execução do protocolo. ....	13
Figura 2.2: Preparação do extrato de banana: a) filtro de café sobre gobelet, b) colocação do homogeneizado de banana, c) filtração do homogeneizado. ....	14
Figura 2.3: Adição do etanol frio: a) materiais utilizados, b) adição de 5 ml de etanol frio ao extrato de banana. ....	14
Figura 2.4: Recolha do ADN: a) ansa removendo o ADN precipitado no etanol; b) ansa com uma massa filamentososa esbranquiçada gelatinosa. ....	15
Figura 2.5: Precipitação do ADN nos tubos de ensaio contendo extratos de manga, banana e goiaba, após adição do etanol frio. ....	15
Figura 2.6: Precipitação do ADN no tubo de ensaio contendo extrato de banana, após adição do etanol frio. ---.....	16
Figura 3.1: Estrutura da antocianina delphinidina-3-rutinosídeo. Fonte: Capello (2020), .....	23
Figura 3.2: Concentrações de pigmentos antocianinas extraídos da casca da beringela em diferentes temperaturas. ....	27
Figura 3.3: Diferentes concentrações de pigmentos antocianinas extraídos da casca da beringela por solventes orgânicos. ....	28
Figura 4.1: Variações moléculas e cores características das antocianinas, <i>in arruda et al.</i> (2019). ....	33
Figura 4.2: Mudança estrutural das antocianinas em meio aquoso com mudança de ph <i>in arruda et al.</i> (2019). ....	34
Figura 4.3: Diluição em série para preparação das soluções ácidas. ....	36
Figura 4.4: Diluição em série para preparação das soluções básicas. ....	37
Figura 4.5: Coloração na sequência da esquerda para direita das soluções de ph 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. ....	38
Figura 4.6.: Espectros de varredura dos extratos obtidos de casca de beringela. A) extrato com ph 1; b) extrato com ph 2; c) extrato com ph 5; d) extrato com ph 8; e) extrato com ph 10; e f) extrato com ph 13.....	40
Figura 5.1: Facas externas e internas das conchas, A) <i>Mactra glauca</i> , B) <i>Cerastoderma edule</i> do Algarve, C) <i>Cerastoderma edule</i> do Óbidos e D) <i>Crassostrea gigas</i> . ....	49
Figura 6.1: Extrato hidrofílica de algas marinhas fotossintéticos: <i>P. cartilagineum</i> , <i>S. vulgare</i> , <i>Arthrospira</i> sp., e <i>Ulva</i> sp. ....	62

Figura 6.2: Extrato hidrofóbica de algas marinhas fotossintéticos: <i>P. cartilagineum</i> , <i>S. vulgare</i> , <i>Arthrospira</i> sp., e <i>Ulva</i> sp. ....	63
Figura 6.3: Cromatografia em papel dos pigmentos extraídos de a) <i>Arthrospira</i> sp.; b) <i>Ulva</i> sp., c) <i>Plocamium cartilagineum</i> , d) <i>Sargassum vulgare</i> .....	65
Figura 7.1: Desenho experimental do ensaio de biorremediação ( $n=2$ ). Grupo 1 – controlo formado por água salgada filtrada + 12 mexilhões; grupo 2 – água residual (proveniente da purga da aquacultura) + 12 mexilhões; grupo 3 – controlo formado por apenas água residual. ....	75
Figura 7.2.: Recipientes experimentais contendo água de purga com mexilhões ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ), à esquerda, água salgada filtrada com mexilhões e, à direita, água de purga sem mexilhões, com arejamento. ....	75
Figura 7.3: <i>Secchi stick</i> ou escala de Secchi, em centímetros, utilizada no ensaio .....	76
Figura 7.4.: Escala de turbidez, avaliada através concentrações conhecidas de argila, entre 0 e 0,5%. ....	78
Figura 7.5: Dispositivo de filtração utilizado no ensaio, para medição do material particulado em suspensão .....	79
Figura 7.6: Percentagem média de redução da turbidez no controlo, constituído pela água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão ( $n=2$ ). ....	81
Figura 7.7: Percentagem média de redução da turbidez no controlo, constituído pela água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão. ....	81
Figura 7.8: Material particulado em suspensão (mps) na água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão .....	82
Figura 7.9: Variação da redução do peso da matéria particulada em suspensão (mps), na água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão .....	83
Figura 7.10: Percentagem de variação de peso dos mexilhões ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) expostos à água residual e ao meio de controlo. No grupo de controlo, os mexilhões foram mantidos em água salgada filtrada, enquanto no grupo de água residual, os mexilhões foram expostos à água da purga de aquacultura. Resultados expressos em percentagem média de variação de peso e desvio padrão. ....	83

# Lista de Tabelas

---

Tabela 5.1.: Média $\pm$ desvio padrão do peso de conchas marinhas analisadas, em gramas, antes e depois da adição de ácido clorídrico ( $n = 4$ ) .....	50
Tabela 5.2.: Média $\pm$ desvio padrão da espessura das conchas marinhas analisadas em diferentes pontos, em milímetros ( $n = 4$ ) .....	51
Tabela 5.3.: Média $\pm$ desvio padrão do tempo de reação da concha ao ácido clorídrico, em segundos ( $n = 4$ ) .....	51
Tabela 5.4.: Média $\pm$ desvio padrão de dureza das conchas marinhas utilizando escala de Mohs ( $n = 4$ ) .....	52
Tabela 7.1.: Conversão da transparência, em centímetros, para unidades nefelométricas de turbidez ( $ntu$ ) (Fetter & Koch, 2022) .....	77

# Lista de Siglas

---

NaCl - Cloreto de sódio

ADN - Ácido desoxirribonucleico

mL - Mililitros

PALOP - Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa

EUA – Estados Unidos da América

pH – Potencial hidrogeniônico (medida da acidez ou basicidade de uma solução)

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CaCO<sub>3</sub> – Carbonato de cálcio

HCl – Ácido clorídrico

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

H<sub>2</sub>O – Água

β-caroteno – Betacaroteno (pigmento carotenoide)

Cl. a, b, c – Clorofila a, b, c (pigmentos fotossintéticos)

*P. cartilagineum* – *Plocamium cartilagineum* (alga vermelha)

*S. vulgare* – *Sargassum vulgare* (alga castanha)

UV – Ultravioleta (implícito em referência à absorção de luz e fotossíntese)

nm – Nanómetro (unidade usada para comprimento de onda de pigmentos)

RAS – Recirculating Aquaculture system (Sistema de Recirculação Aquícola)

NTU – Nephelometric Turbidity Unit (Unidade Nefelométrica de Turbidez)

PAR – Photosynthetically Active Radiation (Radiação Fotossinteticamente Ativa)

SS – Sólidos Suspensos

## 1 - ENQUADRAMENTO TEÓRICO

---

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de atividades experimentais na área da biotecnologia, dirigidas a estudantes do ensino secundário. Procurou-se, igualmente, que estas atividades fossem concebidas com recurso a materiais simples e de uso comum, acessíveis nos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP).

Nesta parte introdutória, apresentam-se três subcapítulos fundamentais que sustentam a base teórica deste projeto. O primeiro subcapítulo (1.1), aborda o ensino experimental no ensino das ciências no contexto dos PALOP, destacando a relevância da adaptação dos recursos laboratoriais disponíveis nesses países. O segundo subcapítulo (1.2) aborda o ensino experimental no âmbito das metodologias ativas, enfatizando a sua importância para o protagonismo estudantil. Por fim, no terceiro subcapítulo (1.3), explora-se a importância do ensino experimental para o fortalecimento da aprendizagem das ciências. Esta organização busca proporcionar uma compreensão clara e fundamentada sobre a temática abordada neste trabalho.

### **1.1. PAPEL DO ENSINO EXPERIMENTAL NO ENSINO DAS CIÊNCIAS NO CONTEXTO DOS PALOP**

Ensino experimental no ensino das ciências, é quando o aluno aprende ciências fazendo atividades práticas, ou seja, observando, testando hipóteses, manipulando materiais e analisando resultados. Em vez de só ouvir o professor falar sobre um fenómeno, o aluno vive a experiência: ele toca, testa, observa, erra, refaz e descobre por si próprio.

No contexto dos países africanos de língua oficial portuguesa (PALOP), constata-se a presença desse modelo de ensino, embora com diversas limitações, atribuídas, em grande medida, à escassez de laboratórios, à insuficiência de recursos financeiros destinados à aquisição de reagentes e materiais laboratoriais, entre outros fatores. Diante desse cenário, têm-se intensificado, nos últimos anos, os esforços para conciliar a relevância da prática experimental com a utilização de materiais simples e de fácil acesso (dos Santos Paraíso, 2011).

Focando em primeiro lugar o exemplo de Moçambique, o Plano Curricular do Ensino Secundário Geral destaca a importância de promover, nos alunos, competências e valores que os capacitem a atuar de forma ativa, responsável e empreendedora na sociedade. Além disso, enfatiza que o

estudante deve ser preparado para aplicar o conhecimento adquirido na resolução de problemas e manter-se em constante aprendizagem ao longo da vida.

A realização de atividades práticas e experimentais no ensino de Ciências exige a disponibilidade de materiais de laboratório, domínio técnico dos procedimentos envolvidos e um espaço físico adequado. Além disso, essa abordagem deve permitir que os alunos confrontem as suas concepções intuitivas com evidências empíricas. Diversos estudiosos têm destacado as motivações para a utilização de atividades experimentais, que visam, entre outros objetivos, aumentar o interesse dos alunos, promover a compreensão dos conteúdos científicos por meio do diálogo, estimular o pensamento crítico e criativo, incentivar a colaboração, desenvolver habilidades de observação e interpretação, além de favorecer a compreensão dos fenómenos e do processo de investigação (Azevedo et al., 2022).

Tendo em conta a realidade cabo-verdiana, os objetivos estabelecidos para o ensino secundário no artigo 25.º do Decreto Legislativo n.º 2/2010, propõe-se a realização de um conjunto de atividades experimentais no “Guião de apoio” ao professor, com o propósito de incentivar a prática científica e oferecer aos professores cabo-verdianos recursos pedagógicos que facilitem a implementação do Ensino Experimental da Química no Ensino Secundário. Este material de apoio inclui diversas atividades práticas, desenvolvidas com materiais acessíveis, de baixo custo, fáceis de manusear e que podem ser realizadas mesmo na ausência de laboratórios bem equipados (dos Santos Paraíso, 2011). Todas as atividades apresentadas no *Guião* fundamentam-se na valorização da experimentação, na sustentabilidade e na simplicidade dos materiais utilizados, estando diretamente relacionadas com situações do quotidiano. Cada proposta parte de uma questão orientadora ou motivadora, com o intuito de despertar o interesse dos alunos pelos fenómenos que os rodeiam. O objetivo é levá-los a reconhecer a importância da Ciência na compreensão do mundo à sua volta e no desenvolvimento de uma formação integral, essencial para a construção de uma sociedade em constante avanço tecnológico (dos Santos Paraíso, 2011).

Em diversos países, o ensino de ciências é predominantemente teórico, o que acaba por causar dificuldades de compreensão e falta de interesse por parte dos alunos. Em Cabo Verde, essa realidade também se verifica, uma vez que a abordagem do ensino das ciências costuma seguir métodos tradicionais. De acordo com o Plano Estratégico da Educação 2017 – 2021 (Ministério da Educação de Cabo Verde, 2021), é essencial fortalecer o ensino das ciências tanto nos seus

aspectos teóricos quanto práticos. No entanto, alcançar esse objetivo envolve enfrentar certos obstáculos, especialmente a ausência de materiais de laboratório (Delgado et al., 2023).

Em razão dos elevados custos envolvidos, torna-se necessário desenvolver recursos didáticos alternativos como forma de melhorar a situação atual do ensino de Ciências. Nesse contexto, para atender às exigências de um ensino de qualidade, que estimule a pesquisa, a criatividade e a inovação, conforme estabelece a Lei de Bases do Sistema Educativo de Cabo Verde (Ministério da Educação de Cabo Verde, 2020), a utilização de protótipos educacionais de baixo custo assume um papel essencial, contribuindo significativamente para a construção de aprendizagens fundamentais nas escolas cabo-verdianas (Delgado et al, 2023).

A introdução de práticas experimentais no ensino de Ciências em Angola, foca-se na formação contínua de professores e na implementação de atividades práticas em sala de aula. A necessidade de refletir sobre estratégias que contribuam para a formação de professores em contextos formais de ensino, promovendo práticas inovadoras na Educação em Ciências, foi mencionado como prioritário e urgente no cenário angolano. Nos últimos anos, tem-se percebido um reconhecimento crescente da importância de implementar programas de formação para docentes de todas as áreas. Esse movimento justifica-se, em parte, pelo facto de muitos professores serem contratados sem possuírem formação específica na sua área de ensino, nem agregação pedagógica. Soma-se a isso a desregulação da profissão docente e a escassez de estudos que ofereçam subsídios efetivos para a formação contínua dos professores. Além disso, estudos recentes evidenciam fragilidades na formação docente, especialmente na área das Ciências, o que reforça a urgência de renovar e transformar as práticas pedagógicas. No campo da Biologia, é reconhecido pelos próprios professores que há lacunas formativas significativas, sobretudo no que diz respeito à planificação e condução de atividades práticas (Vaile et al., 2021).

Diante dos desafios trazidos pelos avanços científicos e tecnológicos, a formação pedagógica tornou-se um requisito indispensável para quem pretende seguir a carreira docente. Além disso, é essencial que os professores possuam uma sólida formação científica na sua área de atuação, a fim de garantir que os estudantes atinjam o perfil de saída esperado e estejam preparados para ingressar no Ensino Superior (de Nazaré et al., 2024).

Em relação aos recursos didáticos disponíveis para o ensino da química no 1.º e 2.º Ciclo do Ensino Secundário em Angola, foi destacada a escassez de materiais de laboratório,

equipamentos informáticos e modelos moleculares, recursos que são essenciais para promover um processo de ensino e aprendizagem mais dinâmico e interativo. Apesar disso, há um número considerável de escolas deste ciclo que possuem materiais de laboratório, recursos informáticos e modelos moleculares; contudo, esses recursos não são utilizados com frequência devido à escassez de professores com formação especializada (de Nazaré et al., s d). Quanto ao ensino da química em Angola no 1.º ciclo, as aulas práticas de laboratório estão ausentes. No entanto, alguns professores do 2.º Ciclo, cerca de 29,4%, manifestam ter realizado experiências demonstrativas em sala de aula, com o objetivo de conectar os conteúdos teóricos à prática e, assim, estimular o interesse dos alunos por novas aprendizagens (de Nazaré et al, 2024).

Na Guiné-Bissau, o panorama não é diferente. A escassez de recursos, a inexistência de laboratórios e de equipamentos adequados, bem como a limitada formação dos professores na vertente experimental, constituem obstáculos significativos à implementação destas práticas pedagógicas em contexto de sala de aula.

No contexto da formação de professores na Guiné-Bissau, o ensino ainda se baseia predominantemente em metodologias tradicionais, nas quais o professor ocupa a posição central no processo de ensino-aprendizagem. Essa mesma abordagem é observada no ensino secundário, onde os alunos assumem um papel passivo e atuam apenas como recetores de informações durante as aulas.

Na ausência de uma formação inicial sólida e de oportunidades de formação continuada, os professores na Guiné-Bissau enfrentam dificuldades para modificar suas práticas pedagógicas e incorporar abordagens inovadoras que favoreçam o processo de aprendizagem dos estudantes. Tais transformações tornam-se viáveis apenas quando o docente participa ativamente de programas de formação contínua em sua área de atuação, envolvendo-se em processos de reflexão, investigação e construção de novas metodologias pedagógicas e formas de interação com os alunos (Quadé et al 2024).

Na Guiné-Bissau, pode-se constatar que o ensino experimental em ciências não é implementado, tanto na formação de professores quanto no ensino secundário. A Guiné-Bissau ainda enfrenta sérias limitações no acesso às tecnologias educacionais, sendo a internet um recurso de alto custo e, portanto, de difícil acesso para a maioria dos professores. Essa realidade dificulta a busca por materiais complementares que possam subsidiar a elaboração de aulas, especialmente considerando a escassez de livros didáticos nas disciplinas das ciências exatas e

em outras áreas do conhecimento. A ausência de múltiplas abordagens pedagógicas e de instrumentos que integrem teoria e prática compromete a formação de um repertório didático mais diversificado. Conseqüentemente, os docentes dispõem de recursos limitados para inovar em suas práticas pedagógicas, dificultando a contextualização dos conteúdos científicos tanto em sala de aula quanto em ambientes externos (Quadé et al 2024).

Na Guiné-Bissau, o ensino de ciências caracteriza-se por ser predominantemente mecânico e desprovido de livros didáticos nas instituições de formação docente e nas escolas de ensino médio. Em substituição, os professores elaboram seus próprios fascículos para uso em sala de aula, de forma individualizada por disciplina. A escassez de recursos materiais e a ausência de programas de formação continuada dificultam a realização de atividades práticas no ensino de ciências, o que compromete a construção significativa do conhecimento e contribui para a redução do interesse dos estudantes por essas áreas (Quadé et al 2024).

## **1.2. ENSINO EXPERIMENTAL NO CONTEXTO DAS METODOLOGIAS ATIVAS**

O ensino experimental é um tipo de ensino que envolve a prática, testes e experiências na aprendizagem, em vez de se dedicar apenas à componente teórica. Ou seja, o aluno aprende fazendo, explorando, testando hipóteses e observando resultados.

Diante desse contexto, as Metodologias Ativas de Aprendizagem foram concebidas com a finalidade de promover o envolvimento ativo dos estudantes na construção do próprio processo de aprendizagem. Com o intuito de favorecer uma melhor compreensão dos fundamentos que norteiam as Metodologias Ativas, recorreu-se a um provérbio chinês atribuído ao filósofo Confúcio, o qual afirma: O que eu ouço, eu esqueço; o que eu vejo, eu lembro; o que eu faço, eu compreendo (Silva, 2022).

Diante do exposto, é possível afirmar que as Metodologias Ativas de Aprendizagem favorecem o estímulo e o desenvolvimento de diversas competências, tanto práticas quanto intelectuais, como a criatividade, além de promoverem competências socio emocionais, tais como o pensamento crítico, a capacidade de interação e a resolução de problemas. Isso deve-se ao facto de proporcionarem ao estudante a liberdade para expressar as suas ideias e reflexões, contribuindo para a construção de um conhecimento próprio e significativo. Por essa razão, os princípios que fundamentam as Metodologias Ativas auxiliam os discentes a estabelecer

conexões com situações do cotidiano, alinhando-se também aos objetivos da alfabetização científica, que busca desenvolver a habilidade de interpretar a realidade de forma crítica, com base em fundamentos científicos (Silva, 2022).

Dessa forma, com base nos pressupostos apresentados, percebe-se que, ao serem aplicadas, as Metodologias Ativas conduzem o educador por um caminho voltado à aprendizagem ativa, uma vez que o estudante é incentivado a construir o seu próprio saber. Esse processo difere substancialmente da lógica tradicional de ensino, caracterizada pela recepção passiva de informações transmitidas exclusivamente pelo docente. Nesse sentido, as metodologias que promovem a aprendizagem ativa buscam envolver o aluno em atividades nas quais ele precise de se envolver de forma significativa, refletindo continuamente sobre as suas ações e compreensões ao longo do processo. Nesse contexto, em que o discente assume papel protagonista na construção do conhecimento, o professor passa a atuar como mediador, orientando e apoiando a trajetória de aprendizagem, deixando de ser a única fonte de saber e informação no ambiente educacional (Silva, 2022).

Considerando os elementos que impulsionam as práticas nas Metodologias Ativas de Aprendizagem, refletiu-se sobre o cenário construído por essas abordagens, o qual configura uma estrutura que envolve os estudantes em um ambiente significativamente distinto daquele proporcionado pelo modelo acadêmico tradicional. Conforme evidenciado na literatura, a transformação proposta por essas metodologias incide sobre todos os aspectos do processo de aprendizagem ativa, desde o modo como o estudante é amparado pelo ambiente educacional e pelo docente, até a promoção da autonomia e da emancipação intelectual. Essa abordagem favorece a compreensão, por parte do discente, de que a sua participação em atividades individuais é essencial para a construção do próprio saber, enquanto as interações em grupo possibilitam o debate de ideias, o contacto com diferentes perspectivas e o desenvolvimento de um pensamento mais crítico e complexo. Além disso, o eixo instrucional atua no esclarecimento de dúvidas, oferecendo suporte necessário para que o estudante possa trilhar, com maior segurança, o seu percurso de aprendizagem (Silva, 2022).

### **1.3. IMPORTÂNCIA DO ENSINO EXPERIMENTAL NO ENSINO DAS CIÊNCIAS**

É essencial que o trabalho laboratorial no ensino de Ciências envolva a realização de atividades variadas em sala de aula, tanto em relação aos objetivos que se pretende alcançar quanto ao nível de autonomia proporcionado aos estudantes. Para isso, é importante conciliar

demonstrações realizadas pelo professor com a execução prática de experiências pelos próprios alunos, promovendo maior envolvimento, motivação e compreensão dos conteúdos. Além disso, destaca-se a importância da diversificação e da integração de diferentes técnicas de avaliação, de modo a contemplar de forma mais ampla e eficaz o processo de aprendizagem dos discentes (Ferreira, 2011).

É indiscutível a relevância das atividades laboratoriais para o processo formativo dos estudantes de Ciências, considerando as suas múltiplas dimensões. A participação ativa dos discentes na realização dessas atividades é essencial não apenas para o desenvolvimento cognitivo relacionado com a compreensão dos conteúdos específicos, mas também para o fortalecimento do compromisso e da motivação diante do processo de aprendizagem. As atividades laboratoriais exercem uma influência significativa no processo de ensino e aprendizagem, uma vez que favorecem a compreensão e a interpretação de fenômenos essenciais para a formação das novas gerações. Além disso, contribuem para a aquisição de competências relevantes à prática da cidadania e para o desenvolvimento do pensamento crítico, aspectos fundamentais para a atuação consciente e responsável na sociedade contemporânea (Ferreira, 2011).

As vantagens da inserção da dimensão prática, laboratorial ou experimental no ensino de Ciências podem ser compreendidas por meio de diversos aspectos relevantes. Primeiramente, essa abordagem permite ao estudante buscar respostas para situações-problema, promovendo a articulação entre teoria e prática, além de possibilitar a exploração e análise dos resultados obtidos. Também proporciona a oportunidade de confrontar as suas concepções prévias com a realidade observada, favorecendo uma aprendizagem mais significativa. Ademais, estimula o desenvolvimento da capacidade de observação e desperta a curiosidade científica. Outro ponto importante é que contribui para a formação de atitudes como iniciativa, persistência e o pensamento crítico. Por meio das atividades experimentais, o aluno aprende a realizar medições, refletir sobre sua precisão e compreender noções relacionadas com as ordens de grandeza. Além disso, esse tipo de prática auxilia na apropriação de leis, técnicas, processos e formas de raciocínio próprios do pensamento científico (Ferreira, 2011).

Para que o trabalho laboratorial contribua de maneira efetiva para o desenvolvimento da literacia científica dos estudantes, é imprescindível que estes assumam um papel ativo no processo, sendo envolvidos em atividades com elevado grau de abertura. Tais atividades devem exigir a identificação de variáveis e a avaliação criteriosa de dados, de modo a reconhecer quais

são relevantes e constituem evidências do fenómeno em estudo. Além disso, é fundamental promover o envolvimento dos alunos por meio da familiarização com procedimentos laboratoriais, do controle e manipulação de variáveis, bem como da análise crítica dos resultados obtidos (Ferreira, 2011).

As atividades laboratoriais constituem uma modalidade de aprendizagem amplamente reconhecida por seu valor educativo por todos os envolvidos na conceção e implementação do ensino de Ciências. Dessa forma, ocupam uma posição de destaque no processo de ensino e aprendizagem, desempenhando um papel fundamental na formação científica dos estudantes (Ferreira, 2011).

Nesse contexto, cabe ao professor utilizar o trabalho de laboratório como uma ferramenta para criar situações em que os alunos possam expressar os conhecimentos que já possuem, investigá-los mais a fundo e reformulá-los. É justamente por meio da exploração e da reelaboração de ideias que ocorre o verdadeiro processo de aprendizagem. Assim, as atividades experimentais desempenham um papel fundamental ao fornecerem evidências concretas que sustentam essas investigações e reformulações. Além disso, essa abordagem pode influenciar as futuras escolhas profissionais dos estudantes, pois as habilidades desenvolvidas por meio dessa metodologia de ensino contribuem para que os alunos se inclinem por áreas em que acreditam poder ter sucesso e que se alinham com a sua identidade pessoal. (dos Santos Paraíso, 2011).

#### **1.4. OBJETIVOS DO TRABALHO NO CONTEXTO DA BIOTECNOLOGIA MARINHA**

A Biotecnologia Marinha é uma área emergente, com enorme potencial para a valorização dos recursos aquáticos e para a promoção do desenvolvimento sustentável, especialmente em regiões costeiras dos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP). No entanto, a sua presença nos currículos do ensino secundário ainda é incipiente, em grande parte devido à escassez de recursos laboratoriais, à falta de materiais didáticos adaptados e à ausência de protocolos experimentais acessíveis que possibilitem uma abordagem prática e contextualizada deste campo do conhecimento.

Diante desse cenário, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de protocolos laboratoriais simples, pedagógicos e economicamente viáveis, com a finalidade de apoiar professores e escolas do ensino secundário na introdução de práticas experimentais no domínio da Biotecnologia Marinha nos PALOP. Os protocolos foram concebidos com base em materiais

de fácil acesso e em temáticas diretamente relacionadas ao meio ambiente local e à biodiversidade marinha, promovendo uma aprendizagem ativa e significativa.

A implementação de protocolos laboratoriais simples e contextualizados em Biotecnologia Marinha apresenta-se como uma resposta pedagógica estratégica e inovadora. Essas práticas incentivam a aprendizagem ativa, a experimentação, a resolução de problemas e o trabalho colaborativo. Trata-se de uma abordagem coerente com os princípios do ensino por competências e com as orientações pedagógicas atuais, que valorizam metodologias participativas e a articulação entre ciência e sociedade.

Com este contributo pretende-se apoiar a consolidação de uma abordagem prática e crítica ao ensino das Ciências Naturais e da Biotecnologia, reforçando o papel da escola como um espaço ativo de construção do conhecimento e de sensibilização para a sustentabilidade dos ecossistemas marinhos.

A inclusão da Biotecnologia Marinha no ensino secundário, por meio de atividades práticas adaptadas ao contexto local, pode também estimular o interesse dos alunos por áreas científicas e tecnológicas ainda pouco exploradas, além de contribuir para a construção de percursos educativos mais alinhados com a sustentabilidade e o desenvolvimento das comunidades costeiras.

Entre os protocolos desenvolvidos, incluem-se:

1. A extração de ADN a partir de frutos tropicais;
2. A análise da dureza e da resistência à acidificação de conchas marinhas;
3. O estudo dos fatores físicos e químicos que afetam a integridade da membrana plasmática em células de beringela;
4. A utilização de antocianinas como indicador natural de pH.
5. A extração de pigmentos fotossintéticos de cianobactérias e macroalgas;
6. A avaliação da capacidade de biorremediação do mexilhão em águas de purga da aquacultura de corvina;

Assim, este trabalho justifica-se como uma proposta pedagógica viável, relevante e transformadora, com potencial para ser replicada e adaptada a diferentes realidades escolares dos PALOP, promovendo uma educação científica mais inclusiva, contextualizada e de qualidade.

## 2 – PROTOCOLO PRÁTICO I - EXTRAÇÃO DE ADN DE FRUTOS TROPICAIS

---

### 2.1. INTRODUÇÃO

A extração de ADN (ácido desoxirribonucleico) de frutas é uma técnica simples e eficaz que permite demonstrar conceitos básicos de biologia molecular, particularmente em contextos educacionais e laboratoriais onde os recursos são escassos. Neste protocolo, utilizamos frutas tropicais como banana, manga e goiaba, que são amplamente disponíveis em países tropicais e que pelas suas características, facilitam a obtenção de material genético. O método baseia-se na lise celular com detergente e sal, seguida da separação de impurezas e precipitação do ADN com álcool. Essa abordagem acessível permite visualizar diretamente os filamentos de ADN, tornando-a ideal para ensino e experimentação básicas.

A ampla aceitação da banana (*Musa spp.*) deve-se aos seus atributos sensoriais e ao seu valor nutritivo, sendo uma fonte de energia, rica em carboidratos, além de possuir minerais como potássio, e vitaminas. A casca da banana funciona como um revestimento natural, fácil de remover, higiénica e, por isso, prática e conveniente (Matsuura, et al 2004). A vantagem da utilização da banana está na sua ampla distribuição mundial, ao longo de todo o ano. É cultivada na Ásia, na América latina e em África, em países de clima tropical (FAO, 2019). A principal vantagem da banana deve-se ao facto de ser triploide (3 conjuntos de cromossomas), o que significa que ela contém mais material genético do que frutas diploides (Perrier et al., 2014). Além disso, as bananas maduras possuem enzimas naturais, como as pectinases e proteases, que ajudam a romper as paredes celulares, facilitando a extração de ADN. A sua textura macia, facilita a homogeneização da amostra sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Além disso, bananas são fáceis de encontrar e de baixo custo.

A manga, por sua vez, é rica em polifenóis e açúcares, os quais podem interagir com o ADN, pelo que o seu processamento é mais complexo (Cavalcante, 2018). Também possui uma polpa macia, facilitando a maceração e a libertação do ADN. Tem uma ampla disponibilidade em países tropicais. A goiaba contém menos polissacarídeos que outras frutas, o que pode ajudar a evitar contaminações na extração, sendo também amplamente disponível e barata em regiões tropicais.

O ADN (ácido desoxirribonucleico) é um tipo de ácido nucleico, formado por uma dupla hélice de nucleótidos. É a principal molécula responsável por armazenar a informação genética em

todos os seres vivos (Dias & Marques, 2014). O ADN foi descoberto por um cientista suíço do século XIX chamado Friedrich Miescher. Em 1869, ele conseguiu isolar o núcleo de leucócitos (um tipo de célula branca do sangue) a partir de pensos cheios de pus, que ele obtinha facilmente em hospitais. Naquela época, os antibióticos ainda não tinham sido descobertos, o que veio a só acontecer em 1928, quando Alexander Fleming descobriu a penicilina. Devido à ausência de antibióticos, infecções graves eram comuns, o que facilitava o acesso a esses pensos (Dias & Marques, 2014). A partir dos núcleos isolados dos leucócitos, Miescher conseguiu extrair substâncias ácidas com alto teor de fósforo, que se mostravam resistentes a enzimas que degradam proteínas, indicando que o composto não era de natureza proteica. Esse novo material foi denominado nucleína. Anos depois, outros investigadores, ao estudar a nucleína, descobriram que ela continha bases nitrogenadas e o açúcar desoxirribose, componentes essenciais da molécula de ADN (Dias & Marques., 2014).

Para a extração do ADN do núcleo celular, é necessário promover a lise da membrana celular e do invólucro nuclear, que pode ser realizada por meio de maceração mecânica ou por ação química da amostra. Existem protocolos que utilizam enzimas para a completa digestão das membranas celulares. No entanto, esses métodos envolvem um maior número de etapas, tornando os procedimentos mais demorados, produzem mais resíduos e aumentam a possibilidade de erros, tendo também um custo mais elevado. Uma abordagem mais simples e rápida é a extração por aumento de temperatura, onde a amostra passa por choques térmicos para romper a membrana celular e libertar o ADN. No entanto, essa técnica é limitada a extrações de ADN em pequenas quantidades. Outro processo químico simples de remoção da membrana celular, a bicamada lipídica da membrana é eliminada por meio da ação de detergentes, como o dodecil sulfato de sódio (SDS). Esse processo também contribui para a inativação de enzimas e ajuda a dissociar o ADN das histonas, proteínas responsáveis pelo envelhecimento da molécula. Por outro lado, a extração com etanol a 4°C é bastante eficaz, uma vez que o ADN é insolúvel no álcool, permitindo a precipitação e a integridade do ácido nucleico (Kotz et al, 2014).

Este trabalho tem como objetivo elaborar um protocolo experimental simples para a extração de ADN de vários frutos tropicais, para verificar qual deles produz os melhores resultados. Pretende-se utilizar um procedimento simples e de fácil execução utilizando materiais correntes. Visa, ainda, obter uma grande quantidade de ADN de forma simples e eficaz, permitindo que

todos os alunos presentes tenham a oportunidade de ver a olho nu um material aglomerado, formado pelos filamentos de ADN.

### **1.1. METODOLOGIA**

O protocolo prático de extração de ADN utilizou vários frutos tropicais: banana (*Musa spp.*), goiaba (*Psidium guajava L.*) e manga (*Mangifera indica L.*). O protocolo foi baseado nos trabalhos de Dias & Marques (2014) e de Kotz e colaboradores (2014). Neste protocolo, foram realizadas adaptações, para tornar o procedimento mais acessível aos alunos do ensino secundário e obter grandes quantidades de ADN, de forma rápida e eficiente.

O procedimento implica 3 etapas principais:

1. Lise celular: Utilização de detergente para promover a quebra das membranas lipídicas, libertando o ADN. A adição de sal ajuda a estabilizar as cargas negativas do ADN e a desagregar as proteínas (que possam estar ligadas ao ADN).
2. Separação de impurezas: nomeadamente por filtração, removendo os resíduos sólidos.
3. Precipitação do ADN: O álcool (etanol) é adicionado porque o ADN é insolúvel nesse meio, permitindo que ele se agregue e se torne visível como um precipitado esbranquiçado.

### **1.2. MATERIAIS**

Frutos tropicais: 1 banana, 1 manga e 1 goiaba;  
Detergente líquido de lavar louça (Figura 2.1);  
Etanol absoluto (4°C);  
Sal de cozinha (NaCl);  
3 maceradores ou sacos de plástico transparente;  
6 copos limpos ou gobelets;  
6 colheres de chá;  
3 filtros de café;  
3 funis;  
3 Pipetas de Pasteur de 3mL;  
3 tubos de ensaio ou copos transparentes;

3 Ansas descartáveis.



Figura 2.1: Alguns dos materiais usados na execução do protocolo.

### 1.3. PROCEDIMENTO

Primeiro, descascámos a banana e colocámos uma porção de polpa (cerca de 25g) dentro de um saco plástico. A polpa foi macerada vigorosamente durante alguns minutos até adquirir uma consistência pastosa homogênea. Adicionamos, então, seis colheres de chá de água para tornar a pasta mais líquida.

Depois, retirámos todo o conteúdo do saco plástico e colocámos num copo transparente ou gobelet. Adicionámos uma colher de chá de sal e uma colher de chá de detergente, e misturámos com uma colher por cerca de dois minutos, cuidadosamente sem fazer espuma. Em seguida, posicionámos um filtro de café (ou um papel de filtro) sobre outro copo e despejámos lentamente o conteúdo misturado, deixando que o líquido seja filtrado aos poucos, o que demora cerca de 10 minutos (figura 2.2).

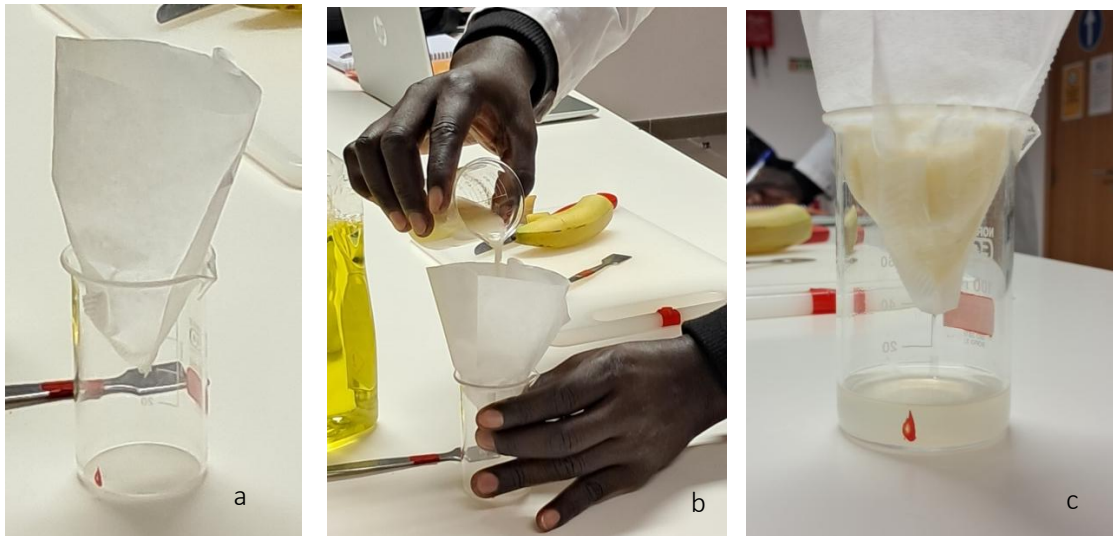


Figura 2.2: Preparação do extrato de banana: a) filtro de café sobre gobelet, b) colocação do homogeneizado de banana, c) filtração do homogeneizado.

A um tubo de ensaio foram adicionados, com uma pipeta de Pasteur, 5 mL do extrato obtido por filtração. Fez-se escorrer, cuidadosa e lentamente, 5 mL de etanol frio (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) ao longo da parede do tubo de ensaio (Figura 2.3), também com uma pipeta de Pasteur. Observou-se a formação de duas fases, a superior é a fase alcoólica e a inferior é a fase aquosa do extrato de banana. Conforme a solução se mistura, começaram a aparecer fios esbranquiçados, que são aglomerados de moléculas de ADN.



Figura 2.3: Adição do etanol frio: a) materiais utilizados, b) adição de 5 ml de etanol frio ao extrato de banana.

Com uma ansa descartável, cuidadosamente, recolheu-se o ADN precipitado no seio do etanol, formado por um novelo esbranquiçado gelatinoso (figura 2.4).

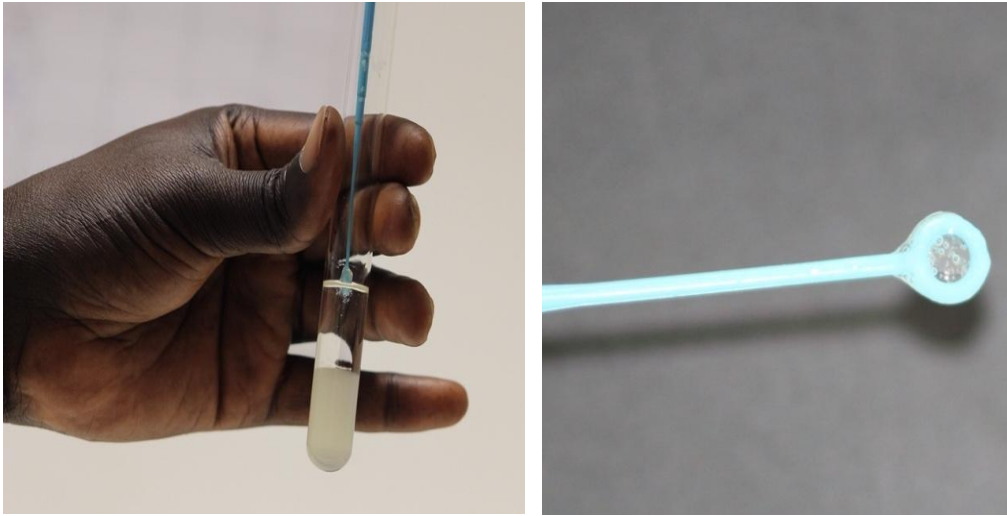


Figura 2.4: Recolha do ADN: a) ansa removendo o ADN precipitado no etanol; b) ansa com uma massa filamentososa esbranquiçada gelatinosa.

Repetiram-se os passos acima indicados para os outros dois frutos, a goiaba e a manga.

#### 1.4. RESULTADOS

Os resultados obtidos mostram que houve purificação do ADN nas 3 amostras analisadas, de manga, banana e goiaba. O procedimento mostrou-se, por isso, eficaz na extração do ADN, independentemente do fruto utilizado. Porém, a amostra de banana apresentou precipitação mais rápida, em menor tempo e com grande quantidade de filamentos de ADN bem visíveis (Figura 2.5).

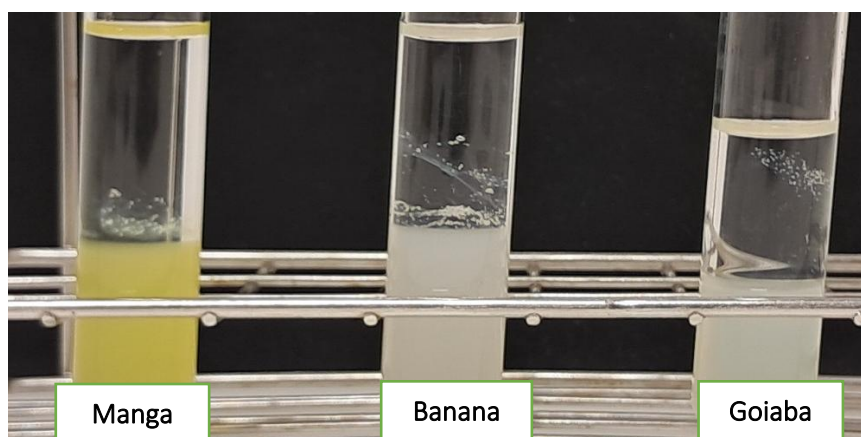


Figura 2.5: Precipitação do ADN nos tubos de ensaio contendo extratos de manga, banana e goiaba, após adição do etanol frio.

De acordo com os resultados, a Figura 2.6 mostrou que a amostra de banana apresentou uma grande quantidade de filamentos de ADN bem visíveis, que podem ser facilmente capturados com uma ansa.

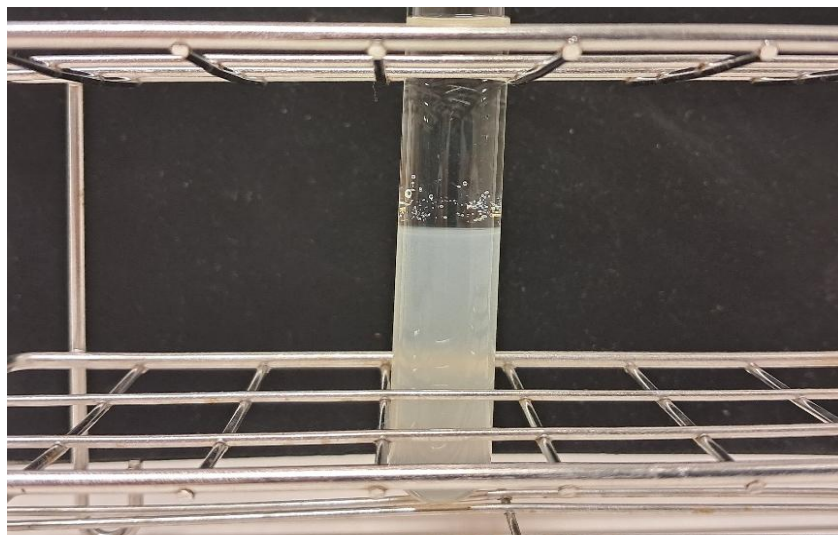


Figura 2.6: Precipitação do ADN no tubo de ensaio contendo extrato de banana, após adição do etanol frio.

## 1.5. DISCUSSÃO

O resultado mostrou que o ADN dos vários frutos analisados, especialmente a banana, precipitou e é claramente visível a olho nu. O detergente atua rompendo a bicamada lipídica das membranas celulares da fruta, libertando o ADN. Portanto, o detergente desnatura as proteínas, separando-as do ADN cromossómico. Assim, o detergente líquido é usado para desnaturar e dissolver os constituintes lipídicos das membranas biológicas (Tosta et al., 2020). O sal (NaCl) cria um ambiente favorável para o ADN, ajudando a evitar que a molécula se quebre, pois fornece iões positivos e negativos que neutralizam as cargas do ADN em contacto com a água. Assim, o sal impede as repulsões elétricas entre as moléculas de ADN, facilitando a sua agregação em filamentos espessos e compridos, visíveis a olho nu (Mangaravite et al, 2020). A adição de álcool gelado a um ambiente com sal, permite a separação de duas fases, uma menos densa, formada pelo etanol e outra mais densa, formada pelo extrato aquoso. Uma vez que o ADN é também menos denso do que a água, move-se lentamente para a superfície. O ADN torna-se menos solúvel na solução alcoólica, formando uma massa filamentosa esbranquiçada

gelatinosa, permitindo a visualização de um emaranhado de suas moléculas (Mangaravite et al, 2020, Tosta et al., 2020).

Por fim, a extração do ADN a partir da banana demonstrou-se muito eficaz. Considerando que a banana é um fruto amplamente disponível em todo o mundo, a sua utilização neste protocolo é particularmente vantajosa em comparação com os outros frutos testados, o que se pode justificar devido ao facto de ser um fruto triploide (Cordeiro, et al., 2022) e logo mais rico em ADN. A abundância e a eficácia do processo tornam a banana uma escolha ideal para este tipo de extração.

## **1.6. APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

Este trabalho prático, que aborda a extração de ADN de frutas, como a banana, é uma forma eficaz de ensinar os alunos sobre biologia celular e genética de maneira prática e visual. Isso reforça o entendimento do material genético e dos processos que o envolvem. A prática auxilia na compreensão de como as técnicas de extração de ADN podem ser utilizadas para estudar a diversidade genética das plantas, facilitando ainda trabalho de investigação em ecologia e conservação. Além disso, introduz noções de como a extração de ADN é um primeiro passo fundamental em processos de clonagem, modificação genética e desenvolvimento de organismos transgênicos.

Com a crescente preocupação com as alterações climáticas e a segurança alimentar, técnicas de extração e manipulação de ADN vegetal podem ser usadas para criar variedades de plantas mais resistentes a pragas e condições ambientais adversas. Essa prática inicial com ADN de banana pode ser um primeiro passo para futuros cientistas entenderem como tais processos funcionam. O conhecimento sobre a extração e análise do ADN vegetal pode se expandir para a pesquisa de substâncias bioativas presentes nas plantas, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos e terapias. Ao aprender técnicas básicas de biotecnologia, os alunos podem ser incentivados a seguir carreiras em ciência e tecnologia, contribuindo para futuros avanços em áreas como biotecnologia, genética e bioinformática.

### **QUESTÕES PARA DEBATE EM SALA DE AULA**

1. Por que usamos detergente na extração de ADN?
2. Qual é o papel do sal na mistura de extração?

3. Por que é necessário amassar a fruta antes de misturar com os reagentes?
4. O que acontece na etapa final de adição de álcool?
5. O que significa dizer que “o ADN está em todas as células”?
6. O que mais te surpreendeu ao ver o ADN da fruta com os teus próprios olhos?

## 3 – PROTOCOLO PRÁTICO II - FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS QUE AFETAM A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM CELULAS DE BERINGELA

---

### 3.1. INTRODUÇÃO

A membrana plasmática das células é formada por uma fina camada de 6 a 8 nm de espessura, composta por lípidos, proteínas e carboidratos. Uma das principais funções membranares é a regulação e transporte de solutos, evitando a troca indiscriminada entre os componentes das organelas, bem como entre o ambiente intracelular e extracelular. Para cumprir essa função, a membrana contém canais e bombas seletivos, constituídos por proteínas, que controlam a entrada de substâncias necessárias e a saída de outras, conforme as necessidades da célula (Oenning & De Oliveira., 2011).

#### 3.1.1. Fatores físicos e químicos que afetam a integridade da membrana plasmática

A sensibilidade da membrana plasmática a variações de temperatura, pH e solventes orgânicos é crucial para seu funcionamento adequado. A exposição a stress químico ou físico pode resultar na desestabilização da membrana. Por exemplo, mudanças no pH podem romper as ligações químicas das proteínas, especialmente as interações eletrostáticas que sustentam as estruturas terciária e quaternária, alterando assim a conformação das proteínas e levando à sua desnaturação. Essa desnaturação, por sua vez, sempre resulta num aumento da permeabilidade da membrana (Mouga.,2024).

Temperaturas extremas, altas ou baixas, causam stress nas membranas biológicas, podendo levar à sua desestabilização. Com o aumento da temperatura, a energia cinética das moléculas se intensifica, assim como o número de colisões entre elas, resultando numa dilatação dos espaços entre as moléculas e, conseqüentemente, um aumento da permeabilidade. Além disso, a quebra das ligações por pontes de hidrogénio das proteínas aumenta o tamanho dos poros proteicos, o que também eleva a permeabilidade. Eventualmente, a temperatura pode levar à destruição da estrutura da membrana. Quando a temperatura cai abaixo de 37 °C, os lípidos podem passar por uma transição de fase, alterando-se de um estado líquido (fluido) para um estado gelatinoso (semissólido), similar à mudança de água líquida para sólida ao congelar. Nessa faixa de temperatura, a taxa de difusão dos lípidos diminui consideravelmente. As membranas, de facto, são sensíveis ao resfriamento e tornam-se mais permeáveis quando

expostas a temperaturas entre 0 e 10 °C, aumentando a saída de solutos do interior para o exterior da célula. Essa perda de solutos, causada pelo frio, deve-se à mudança de fase que ocorre em todos os fosfolípidos da membrana. Se a temperatura continuar a cair, o congelamento provoca a cristalização das moléculas de água, formando gelo cristalino, o que resulta na expansão das moléculas nessa estrutura devido ao alinhamento das pontes de hidrogênio. Essa expansão leva à ruptura das pontes de hidrogênio entre os lípidos e as moléculas de água ao redor, contribuindo para a desintegração da membrana. Mesmo quando a variação da temperatura não resulta em perda de integridade física da membrana, as modificações que ocorrem afetam a capacidade de realizar a difusão simples, uma vez que a temperatura influencia a proximidade entre os fosfolípidos e, conseqüentemente, a fluidez da membrana (Mouga.,2024).

As bicamadas lipídicas formam-se em ambientes aquosos, e a sua estabilidade depende da presença de água, que permite a formação de interações hidrofóbicas. Os lípidos que compõem as membranas são anfipáticos, o que influencia a sua solubilidade em solventes orgânicos. Solventes orgânicos, tanto polares (como metanol, etanol e acetona) quanto apolares (como hexano e clorofórmio), podem dissolver os lípidos, resultando na desestabilização da membrana plasmática e na lise celular. Os solventes polares interagem com a parte polar dos fosfolípidos, substituindo as pontes de hidrogênio que antes eram formadas com a água. Já a parte apolar dos solventes orgânicos, que consiste em cadeias de acilo, tem afinidade pela parte apolar dos fosfolípidos. Essa interação entre os solventes orgânicos e as membranas provoca diversas alterações, incluindo mudanças nas propriedades mecânicas, permeabilidade e difusão (Mouga, 2024).

Os álcoois de cadeia curta, como o etanol, exercem um impacto significativo nas propriedades das membranas, e esse efeito é influenciado tanto pelo comprimento da parte hidrofóbica do álcool quanto pela sua concentração. As moléculas de etanol, sendo anfipáticas, possuem afinidade tanto pela porção polar dos lípidos da membrana quanto pela porção apolar, o que lhes permite penetrar na bicamada. Assim, o etanol tende a se situar no interior da bicamada, em vez de se concentrar diretamente na interface entre a água e a membrana. O etanol forma pontes de hidrogênio com a parte polar dos lípidos da membrana, enquanto a sua porção apolar se liga à parte apolar dos lípidos, resultando num aumento da desordem nas cadeias de acilo. Além disso, a presença de etanol pode induzir a formação de fases interdigitadas, nas quais as

cadeias de acilo de um folheto da bicamada penetram no folheto oposto, resultando na redução da espessura da bicamada e na eliminação do plano médio da mesma (Mouga, 2024).

A acetona também é um solvente orgânico polar, mas apresenta uma polaridade muito menor do que o etanol, devido à presença de um grupo carbonilo no centro da molécula, enquanto o etanol possui um grupo hidroxilo em sua extremidade. Os fosfolípidos da membrana conseguem tolerar a presença de acetona em baixas concentrações. No entanto, o aumento da concentração de acetona provoca desorganização no empacotamento dos fosfolípidos e eleva a fluidez da membrana. A parte polar das moléculas de acetona interage com a porção polar das cabeças dos lípidos, afastando-as umas das outras. Além disso, a região das caudas acilo dos lípidos da membrana se torna menos densa. O mecanismo de ação da acetona na bicamada fosfolipídica compartilha várias características com os efeitos do etanol (Mouga, 2024).

Por fim, a dissolução de solventes orgânicos na bicamada lipídica interage com as proteínas transmembranares, levando a alterações em sua conformação. A modificação na forma dessas proteínas transmembranares impacta diretamente sua funcionalidade. Dessa forma, não apenas aumenta a fluidez da membrana, mas também altera a maneira como a membrana interage com as proteínas, comprometendo o seu funcionamento (Mouga, 2024).

### **3.1.2. As células de beringela (*Solanum melongena*), como modelo experimental**

A beringela (*Solanum melongena*), que faz parte da família Solanaceae, é o fruto de uma planta arbustiva originária do sudeste da Ásia, mas que atualmente está espalhada por diversas partes do mundo. As beringelas podem ter formatos como oblongo, cilíndrico alongado, alongado, oblongo alongado, e apresentar cores que vão do roxo, vinho-escuro-brilhante, roxo-escuro-brilhante até o preto. O tipo mais comum de beringela possui formato oblongo, cor roxo-escuro brilhante, pedúnculo verde e peso médio que varia entre 180 e 250 gramas. Os frutos da beringela são conhecidos por serem de baixo teor calórico e por possuírem uma composição mineral favorável à saúde humana. Além disso, são uma fonte rica em potássio, magnésio, cálcio e ferro, sendo considerados alimentos funcionais devido a essas características (Capello, 2020).

O pigmento principal responsável pela coloração roxa da beringela é a antocianina. As antocianinas foram identificadas pela primeira vez em 1835 pelo botânico alemão Ludwig Marquart, que utilizou as palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul) para nomeá-las. Elas são o componente mais importante de um grupo de substâncias conhecidas como flavonoides, que

são pigmentos bioativos solúveis em água. As antocianinas são responsáveis pelas cores azul, vermelho e roxo, e estão presentes em frutas, flores e vegetais (Capello, 2020). Além de mostrar as cores, também funcionam como antioxidantes, participando do sistema de defesa das plantas, contribuindo para a polinização e a disseminação das sementes (dos Santos Almeida et al., 2020).

As antocianinas, quando extraídas do ambiente natural, aparecem na forma de sais de ião flavílio, geralmente associadas a moléculas de açúcares, sendo os mais frequentes a  $\beta$ -D-glicose, a  $\alpha$ -D-galactose e a  $\alpha$ -D-ramnose (Ferreira, 2011).

### **3.1.3. Funções e aplicações da antocianina**

A adição de antocianinas aos alimentos tem sido amplamente pesquisada com o objetivo de produzir produtos com menos compostos sintéticos ou alimentos funcionais, melhorando suas propriedades existentes e/ou criando produtos inovadores, em benefício da saúde dos consumidores. A aplicação de antocianinas em alimentos já foi investigada em produtos lácteos, como queijo creme, leite fermentado e batidos, além de bebidas com pH baixo e alimentos sólidos, como panquecas e omeletes. Um corante alimentar natural já estabelecido no mercado é o E163, que confere uma coloração roxa aos alimentos e é obtido a partir da casca da uva (Capello, 2020).

As antocianinas são promissoras para a indústria farmacêutica, devido aos seus efeitos benéficos à saúde. Pesquisas na área mostraram que antocianidinas e antocianinas possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, além de contribuir para a saúde visual e neurológica, oferecendo proteção contra várias doenças não transmissíveis, como câncer e diabetes. Esses efeitos envolvem diversos mecanismos e vias, incluindo a eliminação de radicais livres, a via da ciclo-oxigenase, a via da proteína-quinase ativada por mitógeno e a sinalização de citocinas inflamatórias (Capello, 2020).

Aplicações também foram realizadas no campo da encapsulação, visando estabilizar as antocianinas (ACN) frente a fatores externos, como luz e temperatura, mantendo-as ativas para serem utilizadas em alimentos e medicamentos, por exemplo: bagaço de uva, resultante do processo de vinificação, foi utilizado como fonte de ACN para a produção de microcápsulas de goma arábica e maltodextrina, através da técnica de liofilização. Os resultados mostraram que

até 91,5% da ACN foi retida nas cápsulas, e as microcápsulas de goma arábica apresentaram maior atividade antioxidante (Capello, 2020).

#### 3.1.4. Antocianinas da casca da beringela

A casca da beringela é uma fonte rica e acessível de antocianinas, disponível a baixo custo em mercados ao redor do mundo. Estudos indicam que a quantidade total de antocianinas na casca varia de 45 a 85,7 mg por 100 g de casca húmida. Diversos tipos de antocianinas foram identificados na casca da beringela, sendo que a delfinidina-3-rutinosídeo foi apontada como a antocianina predominante, conforme estudo realizado em mercados dos Estados Unidos da América (EUA) (Capello, 2020).

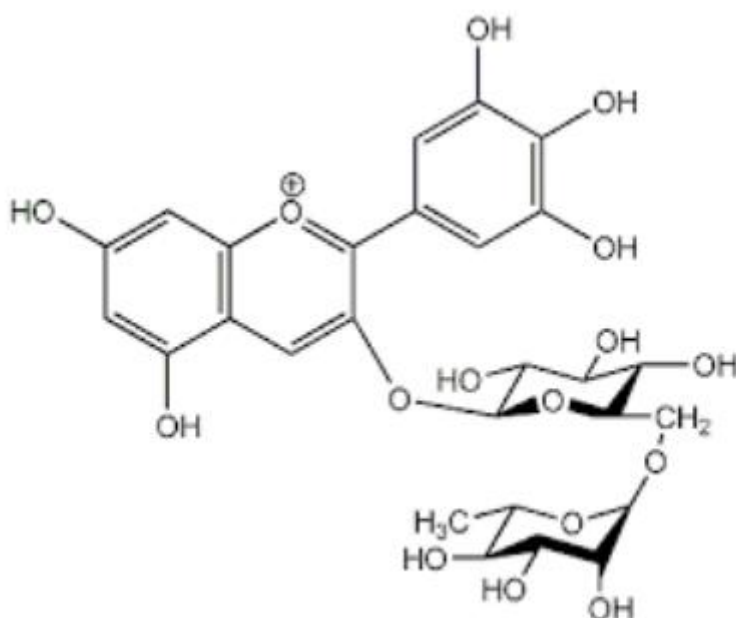


Figura 3.1: Estrutura da antocianina delfinidina-3-rutinosídeo. Fonte: Capello (2020).

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo experimental simplificado para analisar fatores físicos e químicos que afetam a integridade da membrana plasmática em células de beringela, voltado para alunos do ensino secundário ou superior. Assim, procura-se entender as influências de diferentes temperaturas e diferentes solventes em diversas concentrações na solubilidade dos lípidos e na desnaturação das proteínas, utilizando materiais simples e de baixo custo.

## **3.2. METODOLOGIA**

O protocolo prático experimental foi em parte baseado no trabalho de (Mouga 2024; Gonçalves, T. M. 2021). Neste protocolo, foram realizadas adaptações para tornar o experimento mais acessível aos alunos do ensino secundário, além de inserções que possibilitam uma discussão mais ampla entre o professor e os alunos.

### **3.2.1. Efeito de stress térmico sobre a membrana plasmática/ Efeito de temperatura.**

#### **3.2.1.1. Materiais**

Para determinar o efeito da temperatura foram utilizados os seguintes materiais:

- 1 beringela (*Solanum melongena* L.);
- 1 Placas de aquecimento com agitação;
- Geladeira ou gelo;
- Vórtex;
- 2 Gobelets;
- Água destilada;
- 3 Tubos de ensaio;
- Suporte de tubos de ensaio;
- 1 Termómetros;
- Tábua e faca;
- Régua;
- Pinça;
- Pipeta de 10 mL ou pipeta de Pasteur);
- Caneta de retroprojctor.

#### **3.2.1.2. Procedimentos**

Em primeiro lugar, foi retirada a casca de uma beringela (*Solanum melongena* L.) com auxílio de uma faca e cortados retângulos de casca, com cerca de 1 cm de largura e 2 cm de comprimento.

Foram numerados 3 tubos de ensaio, de 1 a 3, e as temperaturas correspondentes foram anotadas com Caneta de retroprojctor da seguinte forma: Tubo 1: 60°C, Tubo 2: 20°C, Tubo 3: -

20°C. Foram colocados em cada um dos tubos de ensaio 0,3g de retângulos de casca de beringela, com uma pinça.

Nos tubos de ensaio 1 e 2 foram adicionados 10 mL de água destilada. O tubo de ensaio n.º 1 foi colocado num gobelet com água previamente aquecida a 60°C, numa placa de aquecimento com agitação. Nesse gobelet foi colocado um termómetro para controlar temperatura. O tubo de ensaio n.º 2 foi mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Os dois (2) tubos foram deixados em repouso por 25 minutos. Após esse período, foram colocados num suporte de tubos de ensaio.

O terceiro tubo foi colocado no congelador (a cerca de -20°C). Esse tubo de ensaio foi deixado em repouso durante 30 minutos. Ao fim deste tempo, foi adicionado 10 mL de água destilada, à temperatura ambiente e aguardaram-se 20 minutos. Após os 20 minutos de espera, o tubo de ensaio foi agitado manualmente de forma vigorosa ou vigorosamente no vórtex até que o conteúdo adquirisse uma cor uniforme.

### **3.2.2. Efeito dos solventes orgânicos sobre a membrana plasmática/ Efeito de solventes orgânicos.**

#### **3.2.2.1. Materiais**

Para testar o efeito dos solventes orgânicos, foram utilizados os seguintes materiais e soluções:

- 1 beringela (*Solanum melongena* L.);
- Soluções de Acetona comercial, 20% e 60%;
- Soluções de etanol comercial, 20% e 60%;
- Vórtex;
- 5 Tubos de ensaio;
- Suporte de tubos de ensaio;
- 5 Pipetas de 10 mL ou pipetas de Pasteur;
- 4 Gobelets;
- Água destilada;
- Tábua e faca;
- Régua;
- Pinça;

Caneta de retroprojektor.

### **3.2.2.2. Procedimentos**

Retirar a casca da beringela com auxílio de uma faca e corta quantidade de retângulos da sua casca que sejam necessários, com cerca de 1 cm de largura e 2 cm de comprimento.

Cinco (5) tubos de ensaio foram numerados de 1 a 5, e em cada um deles foram registados o solvente e a concentração correspondente, da seguinte forma: Tubo 1 contém 20% de acetona; Tubo 2 contém 60% de acetona; Tubo 3 contém 20% de etanol; Tubo 4 contém 60% de etanol; e o Tubo 5 contém água destilada.

Em cada tubo de ensaio foi colocado com auxílio de uma pinça cinco (5) retângulos da casca da beringela. Ao tubo n.º 1 foi adicionado 5 mL de uma solução de 20% de acetona. Ao tubo n.º 2 foi adicionado 5 mL de uma solução de 60% de acetona. Ao tubo n.º 3 foi adicionado 5 mL de uma solução de 20% de etanol. Ao tubo n.º 4 foi adicionado 5 mL de uma solução de 60% de etanol. Ao tubo n.º 5 foi adicionado 5 mL de água destilada. Aguardaram-se 15 minutos, à temperatura ambiente, agitando os tubos de ensaio vigorosamente no vórtex até que o conteúdo adquirisse uma cor uniforme.

### **3.3. RESULTADOS**

Os resultados obtidos para o ensaio de temperatura podem ser notados nos tubos submetidos às diferentes temperaturas. No tubo n.º 1, as cascas de beringela libertam uma maior quantidade de pigmento a 60°C, sendo essa a temperatura em que se observa a cor mais intensa no tubo. Porque o calor perturba as estruturas da bicamada fosfolipídicas, permitindo um maior extravasamento de pigmentos para o meio exterior. Temperatura a 60°C afeta a fluidez das membranas, fazendo com que os lípidos e as proteínas estejam menos compactados. Isso ocorre porque as moléculas de fosfolípidos se movem mais rapidamente, o que pode resultar em uma maior permeabilidade da membrana. Isso permite que iões, nutrientes e outras substâncias se difundam mais facilmente para fora da célula. O aumento da temperatura pode causar a desnaturação de proteínas de membrana, levando à perda de sua estrutura e funcionalidade. Isso pode afetar os canais iônicos, transportadores e outras proteínas envolvidas na sinalização

celular e no transporte de moléculas. No tubo n. 02, houve liberação de uma pequena quantidade de antocianinas em comparação com o tubo n. 01. Essa temperatura não causa grandes danos às estruturas. Dessa forma, sua membrana sofreu poucas alterações que pudessem afetar sua estrutura e funcionalidade. Assim, ocorreram danos à membrana, como rompimento ou perda de integridade (figura 3.2).

No tubo n. 03 (figura 1), as cascas da beringela, congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , apresenta danos na membrana celular devido à formação de cristais de gelo no interior das células. Esses cristais perfuram e rompem a estrutura da membrana plasmática, causando perda de integridade. Como consequência, a membrana se torna mais permeável e perde sua capacidade de regular a entrada e saída de substâncias. Ao retornar à temperatura ambiente, essa rutura leva ao extravasamento dos pigmentos antocianinas para fora da célula. A pressão exercida pelos cristais de gelo pode desorganizar e romper a estrutura fosfolipídica, comprometendo ainda mais a integridade da membrana. Além disso, as proteínas perdem sua forma e função devido ao stress mecânico causado pelos cristais de gelo.

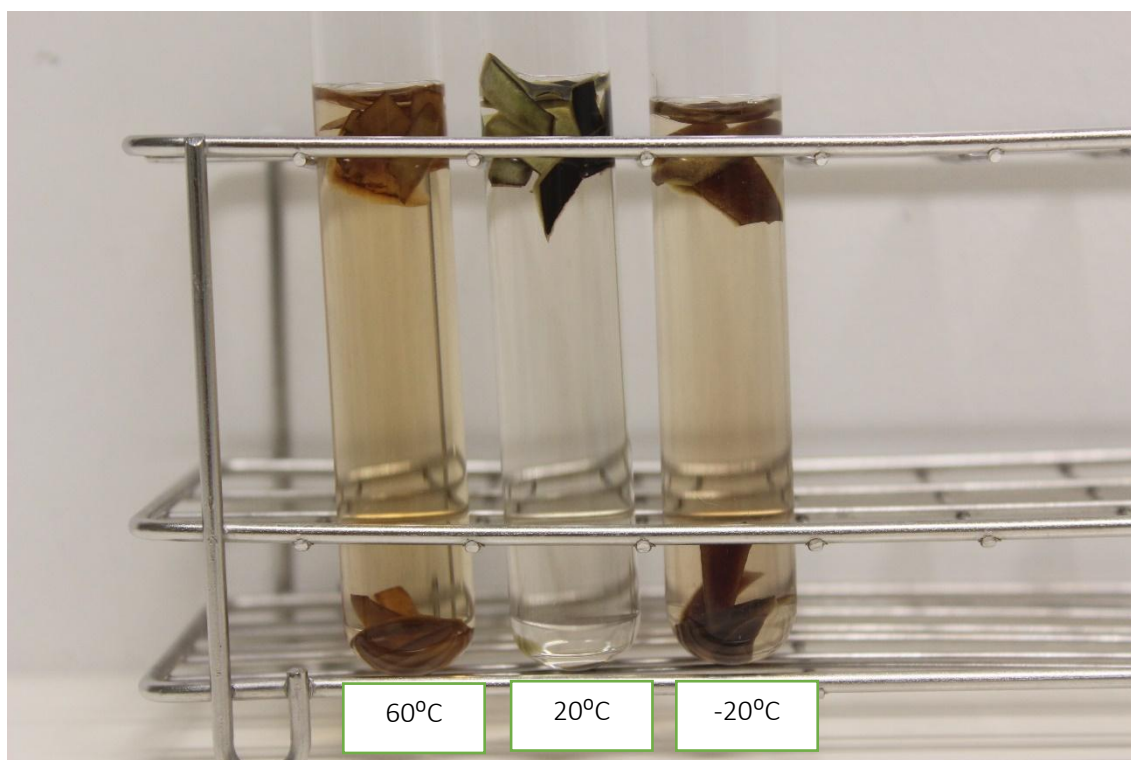


Figura 3.2: Concentrações de pigmentos antocianinas extraídos da casca da beringela em diferentes temperaturas.

Em relação aos solventes orgânicos, os resultados mostram que houve um maior vazamento de antocianinas nas cascas da beringela expostas à acetona em comparação com aquelas submetidas ao etanol, sendo esses resultados influenciados pela concentração de pigmento. De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.3, verificou-se que o controle negativo (água destilada) não interfere na integridade da membrana. Para a solução com 20% de acetona, observou-se uma menor concentração de pigmentos antocianinas extraídos da casca de beringela em comparação com a solução de 60% de acetona. Da mesma forma, a solução com 20% de etanol apresentou uma menor concentração de pigmentos em relação à solução com 60% de etanol. Esse facto indica que, quanto maior a concentração de acetona e etanol, maior é o vazamento de pigmentos antocianinas e, conseqüentemente, a sua concentração na solução.

Solventes orgânicos, como o etanol e a acetona, solubilizam os lípidos que compõem a bicamada da membrana, o que resulta na desestabilização da membrana e na perda de sua integridade. Além disso, esses solventes desnaturam as proteínas de membrana, alterando sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, suas funções. Esse efeito pode prejudicar a atividade de canais iônicos, transportadores e recetores, comprometendo a sinalização celular e o transporte de substâncias. Diante desse facto, os pigmentos foram libertados para o exterior da membrana plasmática, tornando-se visíveis nos tubos de ensaio.

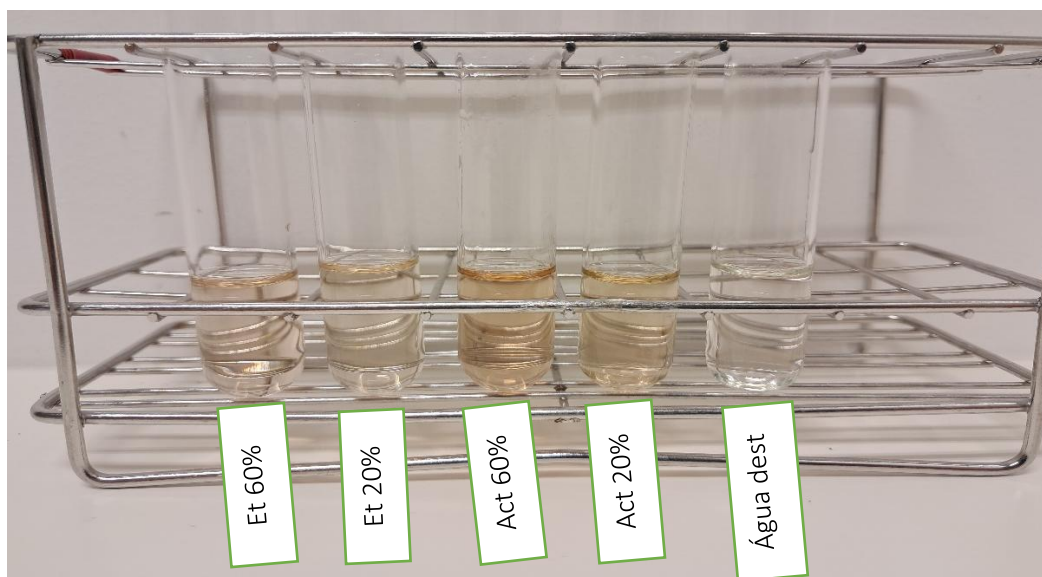


Figura 3.3: Diferentes concentrações de pigmentos antocianinas extraídos da casca da beringela por solventes orgânicos.

### 3.4. DISCUSSÃO

O resultado mostrou que a temperatura de 60°C tornou a membrana plasmática mais fluida e permeável, facilitando a liberação do pigmento presente nas células da casca da beringela. Esse pigmento, que é solúvel em água, escapou para o meio externo com maior facilidade à medida que a permeabilidade da membrana aumentou, especialmente em soluções aquosas. Assim, a temperatura é um dos fatores que influenciam a fluidez das membranas, reduzindo a compactação dos lípidos e das proteínas e tornando a membrana mais permeável e fluida (Gonçalves, 2021).

A temperatura elevada (60°C), os componentes da membrana, como proteínas e lípidos, podem começar a se desestabilizar. As proteínas podem perder sua estrutura natural (desnaturação), enquanto os lípidos se tornam mais desorganizados, o que compromete a integridade da membrana. Por outro lado, a uma temperatura de -20°C, a água dentro e ao redor das células congela, formando cristais de gelo que causam danos físicos à estrutura da membrana, criando rupturas que levam à liberação descontrolada de pigmentos. Também se observou uma quase total ausência de pigmentos a uma temperatura de 20°C, pois essa temperatura não é capaz de causar grandes danos à membrana. Por isso, houve liberação de pigmentos em pequena quantidade.

Relativamente aos solventes orgânicos, a acetona teve um efeito mais marcado na liberação do pigmento do que etanol. A acetona e o álcool são solventes com propriedades hidrofóbicas e atuam solubilizando as caudas de ácidos gordos dos lípidos e desnaturando as proteínas associadas, uma vez que conseguem interferir nas interações hidrofóbicas responsáveis pela estabilidade desses componentes nas membranas. Devido ao seu caráter mais hidrofóbico em comparação com o álcool, a acetona apresentou um efeito mais significativo sobre as membranas, intensificando os danos observados (Galvão et al, 2012). Os efeitos relacionados à concentração de acetona e etanol na liberação do pigmento betalaina. O etanol, sendo um solvente de maior polaridade, pode interagir tanto com as regiões hidrofílicas quanto com as hidrofóbicas dos lípidos anfipáticos da membrana. Além disso, o etanol tem o potencial de modificar as proteínas, provocando sua desnaturação e, com isso, a liberação dos pigmentos. A acetona, embora também seja polar, possui uma polaridade menor. Essa polaridade mais baixa resulta em uma interação menos intensa com a porção polar da membrana, o que causa um

efeito mais moderado na integridade da membrana quando comparado ao etanol (Mouga, 2024).

No que diz respeito à acetona, ela facilita a divisão da membrana na parte hidrofóbica da bicamada, próxima às ligações éster dos fosfolípidos e no começo das cadeias de hidrocarbonetos. Mais uma vez, esse efeito é mais acentuado à medida que a concentração do solvente aumenta. Um aumento na concentração de acetona, conforme observado, provoca uma desorganização significativa do arranjo dos fosfolípidos. As moléculas de acetona afastam a parte polar dos lípidos, resultando também em um aumento da área média por molécula. Além disso, a região da cadeia de carbono da membrana torna-se menos densa. Esses fatores, em conjunto, levam a um aumento na fluidez da membrana e, por fim, podem causar a sua ruptura (Mouga, 2024).

Os álcoois alifáticos de cadeia curta são especialmente prejudiciais às membranas biológicas. Os danos nas membranas decorrem das pontes de hidrogênio formadas entre esses álcoois e a porção polar dos lípidos e, uma vez dentro da membrana, das interações apolares com a parte hidrofóbica dos lípidos. Essas interações causam a desestruturação da membrana e a liberação dos lípidos. A intensidade dessa desagregação e liberação aumenta proporcionalmente ao comprimento da cadeia de carbono do álcool e à concentração do solvente (Mouga, 2024).

### **3.5. APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este trabalho prático ajuda os alunos a compreender a composição e a função das membranas celulares, mostrando como os lípidos e as proteínas que as compõem reagem a diferentes condições. Além disso, os alunos observam, na prática, como variáveis externas, como o calor, e substâncias, como o álcool e a acetona, afetam a permeabilidade da membrana plasmática. Participar de atividades experimentais permite aos alunos desenvolver habilidades práticas, como a manipulação de instrumentos de laboratório e a coleta de dados. Os alunos aprendem a observar mudanças nas células (por exemplo, a hemólise de células vermelhas) e a interpretar o impacto de diferentes tratamentos, fortalecendo a capacidade de análise científica. Essa prática é um alicerce importante para os alunos que seguirão carreiras em biologia, bioquímica ou ciências da saúde, pois introduz conceitos que serão explorados em maior profundidade em estudos posteriores. O estudo de como agentes externos afetam as células pode despertar o interesse dos alunos em áreas como biotecnologia e farmacologia, onde essas interações são fundamentais.

## QUESTÕES PARA DEBATE EM SALA DE AULA

1. O que acontece com a estrutura da membrana plasmática a 60 °C? Por que isso permite a liberação de pigmentos?
2. Por que a membrana das células congeladas a -20 °C sofre danos tão significativos?
3. Em qual tubo observou-se maior liberação de antocianinas? Qual a explicação bioquímica para isso?
4. Como o aumento da temperatura pode afetar as proteínas da membrana
5. Por que a acetona a 60% causou maior liberação de pigmentos do que a 20%?
6. Que efeito os solventes orgânicos têm sobre os lípidos e proteínas da membrana plasmática?

## 4 – PROTOCOLO PRÁTICO III – AS ANTOCIANINAS COMO INDICADOR DE pH

---

### 4.1. INTRODUÇÃO

No século XVII, foram obtidos os primeiros indicadores de pH naturais, um feito atribuído a Robert Boyle. Ele observou que um licor feito de pétalas de violeta mudava de cor em soluções ácidas e básicas. Em meio básico, a coloração verde era percebida, enquanto, ao aplicar esse licor num papel e adicionar gotas de ácido acético, Boyle notou a mudança para o vermelho. Os compostos químicos responsáveis por essas mudanças de cor foram chamados de antocianinas, termo que, em grego, significa literalmente “cor azul” (Arruda et al., 2019). As antocianinas são compostos fenólicos que fazem parte da família dos flavonoides, solúveis em água, e que se acumulam tipicamente no vacúolo de algumas plantas. Conferem tons de rosa, laranja, vermelho, violeta, roxo e azul a muitas flores e frutos. É o caso da casca da beringela cuja cor púrpura escura se deve à antocianina nasunina, estando presente também a delphinidina (Dominguini et al, 2014, Freitas, 2019).

O termo antocianina foi inventado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não era apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes, atribuídas a pigmentos similares aos que deram origem ao termo antocianina. Uma característica marcante das antocianinas, com grande potencial didático, é, de facto, a sua capacidade de alterar a cor conforme o pH do ambiente. Por isso, estas substâncias possuem aplicações tanto na área da saúde, graças ao seu significativo potencial terapêutico, quanto na indústria, sendo utilizadas na produção de vinho e como corantes naturais (Ferreira., 2011).

Além de suas cores vibrantes, essas substâncias atuam como antioxidantes, desempenham um papel importante na defesa das plantas, contribuem para a polinização e auxiliam na dispersão de sementes (dos Santos Almeida et al, 2020). A couve roxa, as uvas, os morangos, as framboesas, a beringela, a acerola, a batata-doce, entre outros, são exemplos de importantes fontes naturais de antocianinas. Entre essas fontes, a couve roxa destaca-se pela alta concentração do composto ou pela coloração intensa de suas folhas, além de apresentar uma estabilidade química notável do corante. Nas uvas e na beringela, as antocianinas estão presentes quase exclusivamente nas cascas, sendo poucas as espécies que apresentam esses compostos na polpa. A extração de antocianinas exige uma cuidadosa atenção às condições

operacionais, pois fatores como o tipo de solvente, a proporção sólido/líquido, a agitação e a temperatura influenciam diretamente o processo (Arruda et al., 2019).

A estrutura básica das antocianinas é formada por uma configuração policíclica com quinze átomos de carbono (dos Santos Almeida et al, 2020). A cor das antocianinas varia principalmente em função do número de grupos hidroxilo e metoxilo ligados à molécula, especialmente no anel onde se encontram os radicais R1, R2 e R3. Quantidade crescentes destes grupos na molécula, determinam a variação de laranja a violeta (Figura 4.1). Essa característica de apresentarem diferentes cores conforme o pH do meio em que se encontram permite o seu uso como indicadores naturais de pH, em diversos estudos (Arruda et al., 2019).

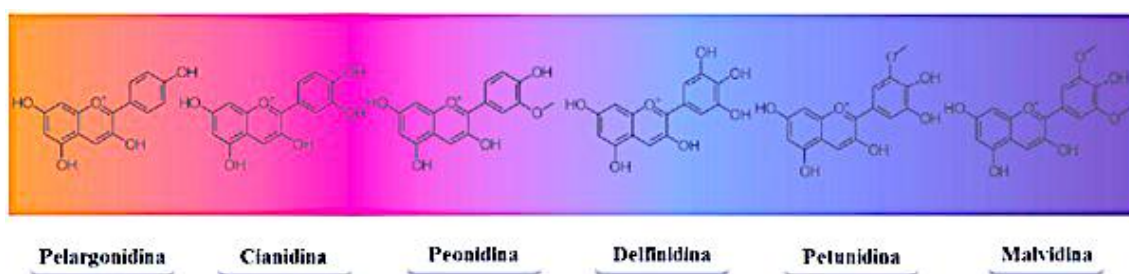


Figura 4.1: Variações moléculas e cores características das antocianinas, *in* arruda *et al.* (2019).

As principais mudanças de cor resultam da conformação do íon flavínio. Essas estruturas são responsáveis pela cor arroxeada em soluções neutras e, com a adição de íons de hidrogénio (em meio ácido) ou a sua remoção (em meio básico), ocorre uma alteração no comprimento de onda de absorção da luz visível, o que provoca mudanças na cor. Além das antocianinas e flavonoides, destacam-se também os carotenoides e as betalainas entre as classes associadas a essa característica (dos Santos Almeida et al, 2020).

Assim, a alteração estrutural da molécula devido à variação do pH provoca mudanças na sua coloração. Em meio aquoso, é possível observar diferentes estruturas em equilíbrio resultantes dessas alterações. As espécies químicas formadas incluem o catião flavílio (vermelho), a base anidra quinoidal (azul), a pseudo-base carbitol (incolor) e a chalcona (incolor ou levemente amarela). Em condições ácidas, as antocianinas predominam na forma catiónica. À medida que o pH aumenta, ocorre uma rápida desprotonação, dando origem à base quinoidal. Em meio aquoso neutro, o catião flavilium sofre hidratação, resultando em um equilíbrio entre as formas

carbitol e chalcona (Arruda et al, 2019). A figura 4.2 ilustra estas alterações estruturais com a variação de pH.

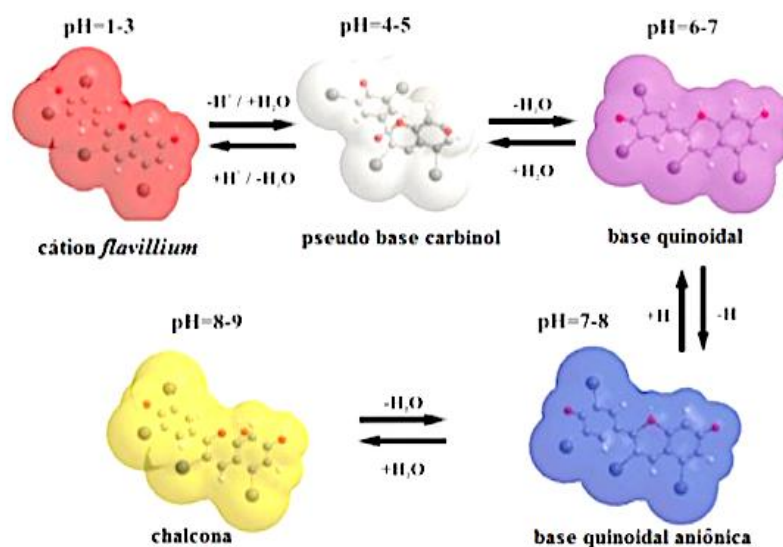


Figura 4.2: Mudança estrutural das antocianinas em meio aquoso com mudança de pH in arruda *et al.* (2019).

Essas diferentes formas estruturais podem ser influenciadas por vários fatores, com destaque para a temperatura, o pH e interações com outras substâncias químicas. Entre esses fatores, o pH é o que exerce maior influência sobre a coloração das antocianinas, pois sua acidez ou alcalinidade determina as variações estruturais que essas moléculas podem assumir (Bordignon et al. 2009). Portanto, as alterações estruturais que ocorrem com a variação do pH são responsáveis pelo surgimento de espécies com colorações distintas, incluindo o amarelo em meios fortemente alcalinos, o verde, vários tons de roxo/lilás, o rosa e o vermelho (Ferreira., 2011).

Este trabalho tem como objetivo investigar e demonstrar a viabilidade da utilização das antocianinas da beringela (*Solanum melongena*) como indicadores de pH, destacando as suas propriedades químicas e o comportamento que apresentam em diferentes níveis de acidez e basicidade. A escolha destas substâncias justifica-se pelo facto de apresentarem todas as características de um indicador. A escolha da beringela deveu-se à sua ampla disponibilidade, não só na Europa, mas também em África, na Ásia e na América, em países com clima quente e temperado.

## **4.2. METODOLOGIA**

O protocolo experimental prático foi, em parte, baseado no trabalho de Santos Almeida et al. (2020). Para isso, foi realizada a extração de antocianinas da beringela, utilizando etanol como solvente, e o calor, e as amostras da solução de antocianinas foram testadas com diferentes tiras de papel medidor de pH. Essa metodologia é simples, econômica e ecológica, aproveitando as propriedades naturais das antocianinas para demonstrar visualmente as variações de pH.

### **4.2.1. MATERIAIS**

Para estabelecer escala de pH através de extrato de antocianinas foram utilizados os seguintes materiais:

1 A beringela (*Solanum melongena* L.)

1 Placas de aquecimento com agitação

Água destilada

14 Tubos de ensaio

Suporte de tubos de ensaio

Tábua e faca

Pinça

Pipeta de 10 mL ou pipeta de Pasteur

Acido clorídrico (HCl) 1M

Hidróxido de sódio (NaOH) 1M

Acetona pura

Almofariz e pilão

Espectrofotômetro digital UV visível (marca, modelo, país).

Balança analítica (marca, modelo, país).

Vórtex (marca, modelo, país).

### **4.2.2. PROCEDIMENTOS**

#### *4.2.2.1. Extração das Antocianinas*

A beringela (*Solanum melongena* L.) foi descascada com o auxílio de uma faca, muito fina, e cortada em retângulos da casca, com cerca de 1 cm de largura e 2 cm de comprimento.

Foram pesados 25,74 g de casca de beringela, que foram colocadas num almofariz e misturadas com 10 mL de acetona para extrair as antocianinas. As cascas foram maceradas com o pilão para permitir a libertação das antocianinas, pelo menos durante 5 minutos. Foram adicionados mais 40 mL de acetona e prosseguiu a maceração até se obter uma cor escura.

#### 4.2.2.2. Preparação das soluções com diferentes pHs

Os tubos de ensaio foram numerados de 1 a 14, sendo os tubos de 1 a 7 destinados ao pH ácido e os tubos de 8 a 14 ao pH básico. As soluções foram preparadas, numa diluição em série, na qual uma sequência de diluições foi efetuada utilizando o mesmo fator de diluição (na proporção de 1 para 10). Assim, para os tubos com solução ácida (figura 4.3) seguiu-se a seguinte sequência de diluições:

- Tubo 1 contém 10 mL de ácido clorídrico 1M.
- Tubo 2 contém 1 mL de ácido clorídrico e 9 mL de água.
- Tubo 3 contém 1 mL da solução do tubo 2 e 9 mL de água.
- Tubo 4 contém 1 mL da solução do tubo 3 e 9 mL de água.
- Tubo 5 contém 1 mL da solução do tubo 4 e 9 mL de água.
- Tubo 6 contém 1 mL da solução do tubo 5 e 9 mL de água.
- Tubo 7 contém 1 mL da solução do tubo 6 e 9 mL de água.

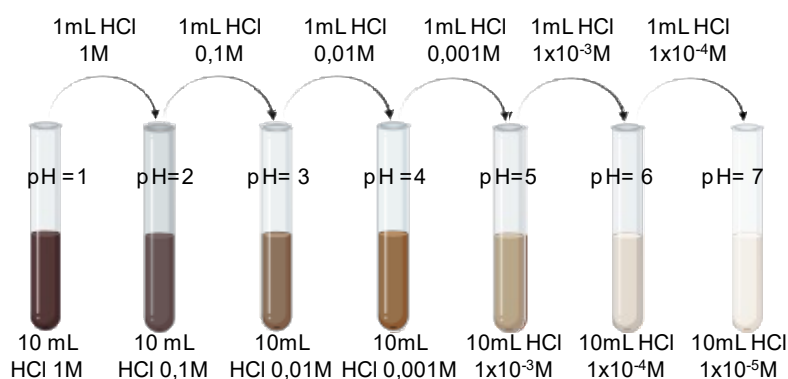


Figura 4.3: Diluição em série para preparação das soluções ácidas.

Repetiu-se o processo, para os tubos de pH básico (Figura 4.4):

- Tubo 13 contém 10 mL de hidróxido de sódio 1M.
- Tubo 12 contém 1 mL de hidróxido de sódio e 9 mL de água.
- Tubo 11 contém 1 mL da solução do tubo 12 e 9 mL de água.

- Tubo 10 contém 1 mL da solução do tubo 11 e 9 mL de água.
- Tubo 9 contém 1 mL da solução do tubo 10 e 9 mL de água.
- Tubo 8 contém 1 mL da solução do tubo 19 e 9 mL de água.
- Tubo 7 contém 1 mL da solução do tubo 8 e 9 mL de água.

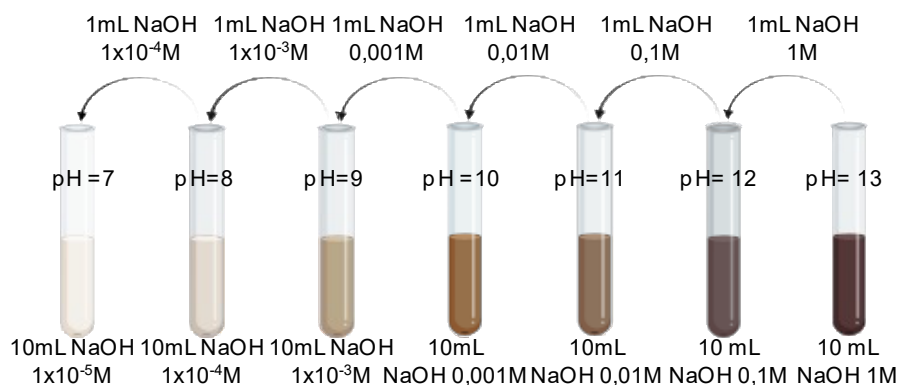


Figura 4.4: Diluição em série para preparação das soluções básicas.

#### 4.2.2.3. Preparação da escala de pH

Para avaliar a funcionalidade do extrato como indicador de pH, os 50 mL de extrato de antocianinas previamente preparado foram transferidos para um gobelé, e 2 mL foram distribuídos, com uma pipeta de Pasteur, entre os tubos de ensaio 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, contendo solução de ácido clorídrico (HCl), e os tubos 13, 12, 11, 10, 9, 8 e 7, contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH).

Os tubos foram agitados em um vórtex até que as soluções apresentassem uma cor uniforme.

### 4.3. RESULTADOS

De acordo com a Figura 4.5, os resultados mostraram que os valores de pH das soluções contendo pigmentos da casca de beringela foram satisfatórios. Os pH's altos (13, 12, 11, 10) do hidróxido de sódio e os pH's baixos (1, 2, 3, 4) do ácido clorídrico apresentaram resultados claros, sendo fácil identificar as cores. Por outro lado, os pH's intermediários, tanto do ácido clorídrico quanto do hidróxido de sódio, foram difíceis de identificar pelas cores.

A variação de pH, representada pela alteração de cor na Figura 4.5, começou com um tom de rosa forte (pH 1), passando por diferentes tons de rosa menos intensos (pH 2, 3 e 4) e, em

seguida, por vários tons de bege-castanho (pH 5, 6, 7, 8 e 9). A transição continuou até o verde (pH 10), para o amarelo-torrado e, por fim, para o amarelo vivo (pH 11, 12 e 13).

O tubo nº 1 corresponde ao valor de pH 1; o tubo nº 2, ao valor de pH 2; o tubo nº 3, ao valor de pH 3; o tubo nº 4, ao valor de pH 4; o tubo nº 5, ao valor de pH 5; o tubo nº 6, ao valor de pH 6; o tubo nº 7, ao valor de pH 7; o tubo nº 8, ao valor de pH 8; o tubo nº 9, ao valor de pH 9; o tubo nº 10, ao valor de pH 10; o tubo nº 11, ao valor de pH 11; o tubo nº 12, ao valor de pH 12; e o tubo nº 13, ao valor de pH 13.

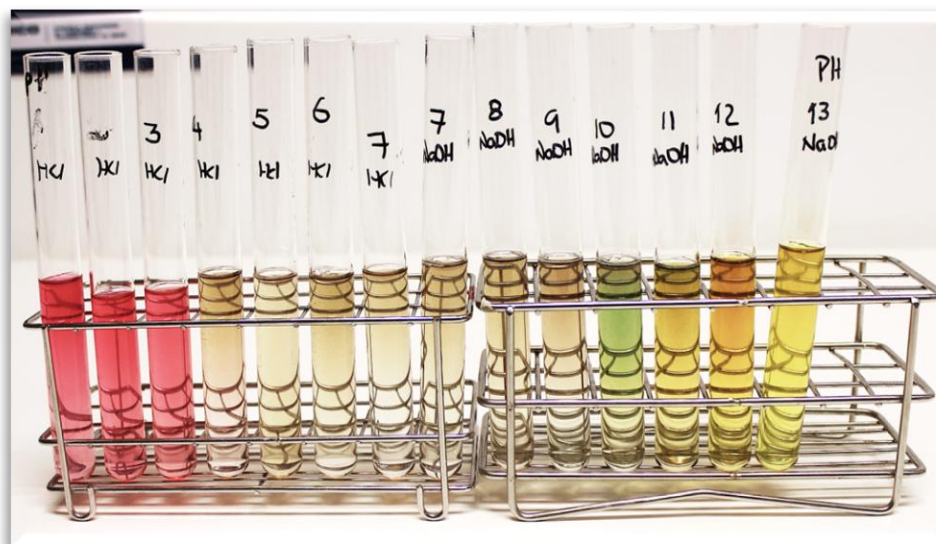


Figura 4.5: Coloração na sequência da esquerda para direita das soluções de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

A análise dos espectros obtidos para os diferentes valores de pH demonstra alterações significativas no perfil espectroscópico e, conseqüentemente, no teor de antocianinas presentes no extrato. A seguir, são descritos os resultados observados para cada condição de pH:

#### *Espectro no Tubo pH 1 (HCl)*

No pH extremamente ácido, foi visível um pico próximo dos 520 nm (figura 4.6A). as antocianinas predominam na forma catiónica flavílica (ou forma rosa, no caso da beringela), que é caracterizada por uma alta intensidade de absorção na região visível. Esse pico sugere que as antocianinas estão em sua forma mais estável e intensa em meios altamente ácidos (Freitas, 2019).

#### *Espectro no Tubo pH 2 (HCl)*

Em pH 2, o espectro mantém características semelhantes ao pH 1, com uma absorção elevada em torno de 520 nm (figura 4.6B), indicando que as antocianinas ainda estão na forma catiónica, mas c. A estabilidade ainda é alta, embora comece a ocorrer a influência de equilíbrios químicos com outras formas da molécula.

#### *Espectro no Tubo pH 5 (HCl)*

Em pH moderadamente ácido, observa-se uma mudança drástica no espectro. Este mostra uma redução significativa da absorvância em 520 nm e há o aparecimento de uma nova banda em comprimentos de onda maiores (geralmente na região de 700 nm). Isso ocorre porque as antocianinas sofrem desprotonação do catião flavílio formando uma base quinoidal e, paralelamente, o catião flavílio começa a converter-se nas suas formas hidratadas (carbitol), incolores, diminuindo a intensidade de cor e absorção. A transição entre as duas formas é evidente a este pH (Figura 4.6C).

#### *Espectro no Tubo pH 8 (NaOH)*

Em pH neutro a levemente básico, as antocianinas podem se converter em formas de quinona, que podem apresentar uma cor verde. A absorção em 520 nm desaparece, e há o aparecimento de uma nova banda na região de 700 nm. Essa mudança indica a conversão das antocianinas para a forma quinonoidal e da forma hidratada, típica de pHs próximos ao neutro e levemente alcalinos (figura 4.6D).

#### *Espectro no Tubo pH 10 (NaOH)*

Em pH básico, a intensidade do espectro volta a sofrer uma alteração profunda, e o pico da forma quinonoidal pode tornar-se menos pronunciado. As antocianinas começam a sofrer degradação oxidativa em pHs elevados, o que reduz sua concentração e altera o perfil espectroscópico, resultando em cores amareladas (figura 4.6E).

#### *Espectro no Tubo pH 13 (NaOH)*

Em pH extremamente alcalino, o espectro mostra uma absorção mínima ou inexistente, indicando a completa degradação das antocianinas, resultando numa cor amarela viva. A

estrutura das antocianinas não é estável em condições tão alcalinas, levando à perda de coloração e quebra das moléculas (figura 4.6F).

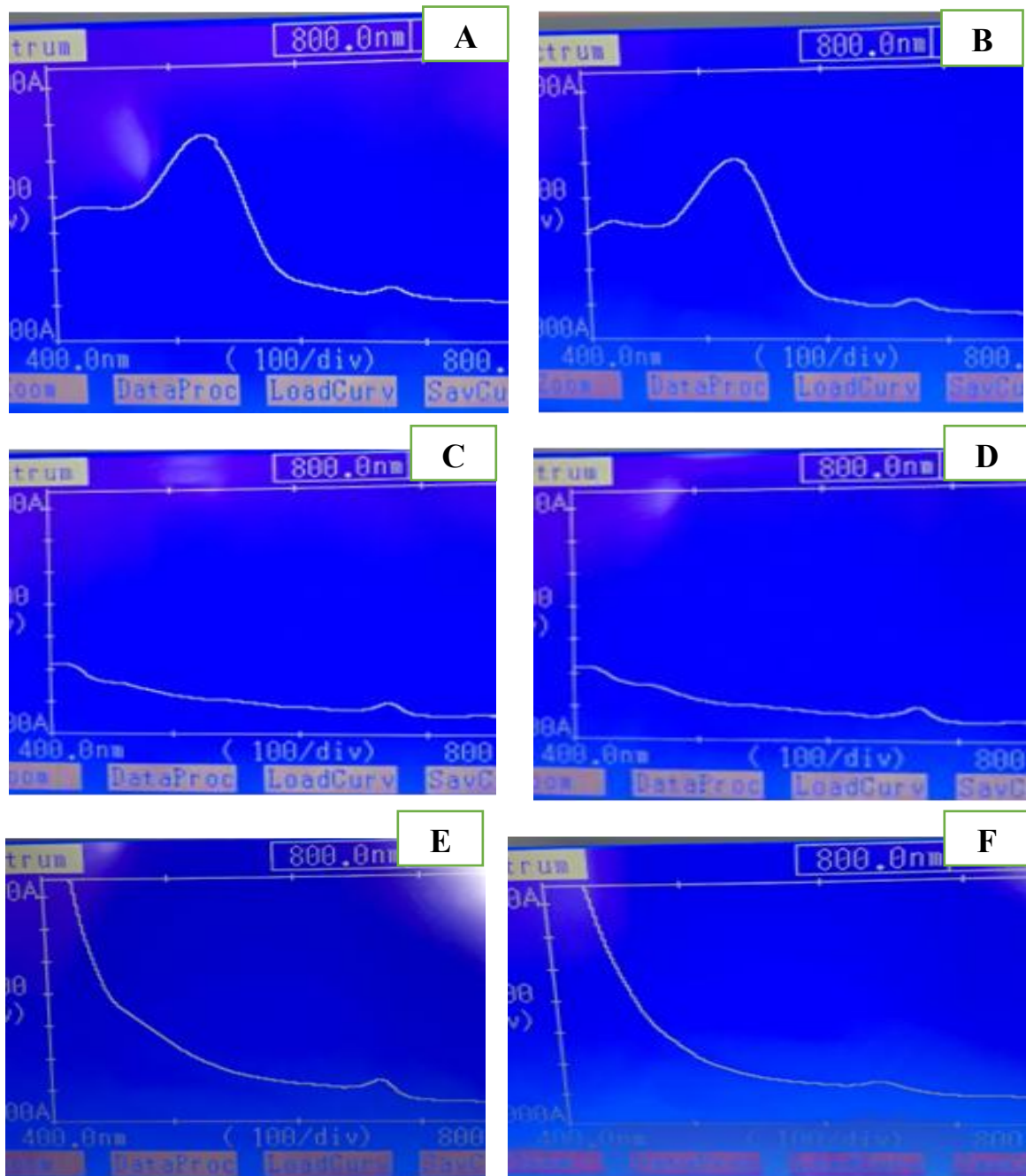


Figura 4.6: Espectros de varredura dos extratos obtidos de casca de beringela. A) extrato com ph 1; b) extrato com ph 2; c) extrato com ph 5; d) extrato com ph 8; e) extrato com ph 10; e) extrato com ph 13.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Conforme o resultado apresentado na Figura 4.3, constatou-se que o extrato obtido da beringela apresentou coloração rósea e bege em meio ácido, e verde, amarelo-torrado e amarela vivo em meio básico, resultado semelhante ao observado por Arruda et al. (2019), que, por meio do método de decocção, registou variações de cor da beringela em função do pH. Estas mudanças de coloração são explicadas pelas alterações na estrutura das antocianinas. Algumas espécies químicas presentes na beringela incluem o catião flavílio (vermelho), a base anidra quinoidal (azul), a pseudo-base carbitol (incolor) e a chalcona (incolor ou levemente amarela). As variações de cor entre diferentes espécies de plantas, por exemplo entre a beringela e a couve-roxa devem-se, provavelmente, à estabilização dos pigmentos por “co-pigmentação” (Freitas, 2019). Ou seja, as moléculas flavílio e quinoidal são pouco estáveis, sofrendo variações da molécula com facilidade. Porém, as interações entre estas moléculas e outros compostos incolores (co-pigmentos, por exemplo, ácidos fenólicos, metais, etc.) formam complexos antocianina-co-pigmento que protegem as antocianinas do ataque de moléculas de água ou à estabilização das formas aniônicas ou catiónicas. Esta co-pigmentação, habitualmente, induz um aumento da intensidade da cor, tornando-a mais púrpura (Freitas, 2019).

Os resultados evidenciam que o pH exerce uma influência direta e significativa no comportamento espectroscópico das antocianinas. Em pHs ácidos (1-2), predomina na forma catiónica, com absorção máxima em torno de 520 nm. Os resultados aqui obtidos mostram grande semelhança com o estudo desenvolvido por Bordignon et al. (2009). Em meio ácido, para valores de pH 1,0 e pH 3,0, observam-se espectros que evidenciam um equilíbrio ácido-base associadas à protonação da estrutura do catião flavílio, que apresenta máximos de absorção nas regiões de 510 nm e 285 nm. Segundo Lopes et al. (2007), os pigmentos isolados foram analisados por espectroscopia UV-visível. Todos os flavonoides apresentam elevada absorbância na faixa de 250 a 270 nm (região UV) e, especificamente, as antocianinas exibem uma absorção intensa na faixa de 520 a 560 nm (região visível). Em pHs moderados (5-8), ocorre a transição para formas incolores ou quinoidais, acompanhada por alterações no espectro. Em pHs alcalinos (10-13), observa-se sobretudo formas ionizadas de chalcona, além uma degradação progressiva das antocianinas, que resulta na diminuição da absorbância e na perda da coloração (Bordignon et al. 2009).

O resultado mostrou que as antocianinas extraídas da beringela apresentaram uma intensidade de coloração adequada para sua utilização como indicador natural de pH. Assim, este estudo demonstra que é viável preparar indicadores naturais, como o extrato de beringela, para aplicação em atividades experimentais de química geral e analítica.

Santos Almeida et al. (2020), utilizou outros frutos de fácil acesso e que podem contribuir para a realização de aulas experimentais. Entre os frutos mencionados, o açaí, a beterraba, a cebola roxa e o repolho roxo destacaram-se como as matérias-primas mais utilizadas, principalmente devido às suas características de baixo custo, fácil obtenção e à capacidade de produzir extratos com coloração bem marcante tanto em meio ácido quanto em meio básico. A mudança de cor observada nessas espécies está associada à presença de antocianinas em sua composição química.

Na batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), na qual as antocianinas também estão muito presentes, as mudanças de cor visíveis variam do vermelho ao verde com variações pH entre 2,0 e 10,0, passando pelo tom rosa em pH 3,0 e 4,0. Quando submerso em soluções pH mais elevado (5,0 a 6,0), o filme adquiriu uma tonalidade castanha; com pH de 7,0 a 8,0, a cor mudou para um castanho-esverdeado claro. A pH entre 9,0 e 10,0, observou-se cor verde começou a se destacar e se intensificou conforme o pH continuava a aumentar (Choi et al, 2017). Estes resultados são bastante semelhantes aos encontrados no presente ensaio. Estes autores Choi et al, (2017) devolveram um novo indicador de pH usando extratos de batata-doce, agar e amido de batata. O emprego de indicadores naturais pode ser uma alternativa para relacionar o estudo de ácidos e bases no contexto da Química Verde e do desenvolvimento sustentável, destacando o valor das matérias-primas provenientes de produtos regionais (dos Santos Almeida et al, 2020).

Para Lopes et al. (2007), a sensibilidade ao pH é um dos principais desafios no processamento e na aplicação das antocianinas, influenciando tanto sua coloração quanto sua estabilidade química.

#### **4.5. APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

As antocianinas podem ser utilizadas para monitorizar a qualidade da água e do solo. Sensores feitos com extratos de antocianinas poderiam ajudar a detetar a acidez ou a basicidade em ambientes naturais, facilitando o controle de poluentes e a análise de ecossistemas. Por serem

seguras e fáceis de obter, as antocianinas podem ser usadas em experiências educacionais para demonstrar conceitos de pH e reações químicas de forma acessível e prática. Isso contribui para tornar a aprendizagem mais interativa e compreensível para os estudantes.

Investigação futura pode se concentrar no desenvolvimento de biossensores que integrem antocianinas para detectar mudanças de pH em processos biológicos, como em diagnósticos médicos ou na monitorização de processos fermentativos. A incorporação de antocianinas em tecidos para criar roupas que mudam de cor com a variação do pH, como aquelas que podem indicar a transpiração ou até mesmo mudanças no estado de saúde, é também uma possibilidade em desenvolvimento.

#### QUESTÕES PARA DEBATE EM SALA DE AULA

1. O que aconteceu com a cor do extrato ao adicionar diferentes substâncias
2. Que tipo de substância (ácida ou básica) provocou uma cor mais avermelhada?
3. E qual provocou uma cor mais esverdeada ou azulada?
4. O que significa "pH"? Por que é importante conhecer o pH das substâncias?
5. Que outras aplicações práticas poderias imaginar para este tipo de indicador natural?

## 5 – PROTOCOLO IV - ANÁLISE DE DUREZA E RESISTÊNCIA À ACIDIFICAÇÃO DE CONCHAS MARINHAS

---

### 5.1. INTRODUÇÃO

Com o acelerado aumento da população no século XX, houve uma procura considerável por alimentos, o que resultou num grande crescimento nas indústrias de aquicultura. Em particular, a criação de moluscos, que representa cerca de 43% da produção de frutos do mar, é uma das áreas mais relevantes na aquicultura marinha. Juntamente com o aumento do consumo de moluscos, surgiram também preocupações em relação ao descarte dos resíduos gerados por essa atividade. As conchas, que compõem a maior parte dos moluscos, são ocasionalmente aproveitadas como fertilizantes ou para fins artesanais, no entanto, a maioria delas acaba sendo descartada e deixada sem utilização nas proximidades dos locais de produção (Yun et al, 2023).

Os moluscos desenvolvem um exoesqueleto rígido em forma de concha, que serve como proteção contra predadores e para resistir à pressão da água no ambiente aquático onde vivem. Essas conchas são formadas pela deposição constante de nácar, produzido pelo próprio molusco na parte interna da concha, o que cria uma barreira contra parasitas e mantém a superfície lisa, evitando a acumulação de corpos estranhos, como grãos de areia (Silva et al, 2010). O nácar é uma substância dura e brilhante composta por camadas de conquiolina, uma proteína estrutural complexa, composta de queratina, colagénio e elastina, produzidos pelo molusco. Essas camadas são alternadas com cristais de calcite ou aragonite (formas de carbonato de cálcio, com diferentes sistemas de cristalização), conferindo alta rigidez e dureza à concha. Além do cálcio, outros elementos químicos podem ser incorporados na estrutura da concha, com concentrações que variam de acordo com fatores como temperatura, pH, salinidade e a composição química da água do ambiente. Por essa razão, as conchas de moluscos bivalves podem funcionar como bioindicadores, sendo úteis para identificar alterações na composição da água provocadas por atividades humanas ou por processos naturais, como os de origem geológica (Silva et al, 2010).

As conchas possuem três camadas distintas: o perióstraco, a camada prismática e a camada nacarada. O perióstraco é a camada externa, composta principalmente por componentes orgânicos, como proteínas e aminoácidos, podendo conter também quitina ((C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>n</sub>), que protege contra abrasão e substâncias ácidas. A camada prismática é formada por cristais de

carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). A camada interna ou nacarada, é composta por finas lâminas de aragonite, que conferem o brilho característico. Ademais, a vaterite, uma variação polimórfica do  $\text{CaCO}_3$ , também pode ser encontrada nas conchas de alguns moluscos gastrópodes (Kutluyer et al, 2023).

O carbonato de cálcio presente nas conchas pode ser aproveitado para aumentar o pH dos solos agrícolas, atuar como aditivo em rações para suplementar cálcio e outros minerais na alimentação, e servir como matéria-prima na produção de materiais de construção, como cimento e cal (de Lima et al., 2022). Dependendo do tamanho das partículas (granulometria), estas podem ser incorporadas como substitutos de ligantes, agregados finos ou agregados grossos em materiais como cimento e argamassas, especialmente (Monteiro, 2022).

Os bivalves marinhos têm sido amplamente destacados em estudos sobre a acidificação dos oceanos devido à sua elevada sensibilidade à redução na taxa de calcificação e à dissolução de estruturas calcárias em ambientes com pH ácido. Isso deve-se ao facto de que os bivalves desempenham um papel essencial nos ecossistemas costeiros, além de serem recursos de grande importância ecológica e económica para a atividade pesqueira. Diversos estudos mostraram que a taxa de calcificação sofreu uma diminuição, enquanto a dissolução das estruturas calcárias provocou uma redução na massa das conchas, levando à perda de sua integridade estrutural e à diminuição de sua resistência. Como efeito da acidificação dos oceanos, essas estruturas tornam-se vulneráveis à dissolução do  $\text{CaCO}_3$ , com esse processo ocorrendo mais rapidamente do que a capacidade de formação das conchas (Nithiyaa et al, 2021).

O objetivo deste trabalho é avaliar a dureza e a resistência aos ácidos de conchas marinhas por meio de testes físicos e químicos. A dureza das conchas pode ser usada como um indicador de resistência às alterações ambientais, como a acidificação do mar.

## **5.2. METODOLOGIA**

Para avaliar a dureza das conchas marinhas, foi desenvolvido um método baseado em testes físicos e químicos, utilizando materiais de baixo custo ou facilmente acessíveis. O objetivo é identificar e confirmar as diferenças entre conchas da mesma espécie, mas de locais distintos, ou de espécies distintas em relação ao peso, à espessura, à dureza e ao tempo de dissolução.

Para tal, foi avaliada a sensibilidade das conchas ao ácido clorídrico, verificando-se a intensidade da reação e o tempo de dissolução para diferentes espécies de bivalves. As conchas que mostraram efervescência imediata e intensa tendiam a ser mais suscetíveis a ambientes ácidos, sugerindo que eram menos resistentes à acidificação do oceano. Cada concha foi avaliada pela escala de Mohs modificada, para verificar a dureza do perióstraco e da camada nacarada. Finalmente, cada concha foi pesada antes e depois da reação com o ácido, e a diferença de peso foi utilizada para quantificar a perda de material devido à dissolução.

### **5.2.1. Materiais necessários**

Craveira (para medir a espessura da concha);

Balança analítica (para pesar a concha);

Ácido clorídrico (1M);

Pipeta de Pasteur (para aplicar ácido na concha);

Conchas marinhas de diversas espécies, colhidas em dois locais diferentes;

Caixa de Petri (para realizar o teste);

Papel filtro ou papel de laboratório;

Pinça (para manuseamento das conchas);

Cronómetro (para medir o tempo de reação);

Escala de Mohs adaptada: unha (2), moeda de cobre (3), faca (4), vidro (5).

### **5.2.2. PROCEDIMENTOS**

#### **5.2.2.1 Preparação da Amostra**

As conchas de diferentes espécies foram selecionadas para comparação da dureza, espessura e sensibilidade ao ácido, com o objetivo de analisar a variação entre diferentes espécies.

Foram utilizadas neste estudo 3 espécies diferentes. Foram apanhadas em diferentes locais (Algarve e Lagoa de Óbidos). Ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) e berbigão (*Cerastoderma edule*) recolhidas na Lagoa de Óbidos (39°42'58"N, 9°14'51"W), berbigão e amêijoia-amarela (*Mactra glauca*), recolhidas no Algarve (37° 8' 3,12"N, 7° 35' 25,02"W).

Para cada espécie/local foram selecionadas 4 conchas de diferentes tamanhos, pesos e espessuras.

A sensibilidade das conchas das diferentes espécies ao ácido clorídrico foi avaliada consoante o tempo da reação e a diminuição do peso.

#### 5.2.2.2. Medidas Físicas

Antes da aplicação do ácido clorídrico, a integridade da superfície de cada concha foi cuidadosamente observada, sendo selecionadas apenas aquelas sem sinais de desgaste, fraturas ou perfurações.

Foi utilizada uma craveira para medir a espessura da concha em diferentes pontos. Geralmente, as conchas variam em espessura, sendo menos espessas nas bordas e mais espessas na parte central.

Cada concha foi pesada numa balança de precisão para determinar o peso seco.

#### 5.2.2.3 Teste do risco

A dureza é uma propriedade mecânica da matéria sólida que determina a sua resistência ao risco. Na Mineralogia utiliza-se frequentemente a Escala de Mohs para quantificar a dureza de um mineral, a qual é composta por 10 minerais (do talco ao diamante) organizados em ordem crescente de dureza. Na ausência destes minerais, foram utilizados vários materiais, de diferentes durezas, para avaliar cada uma das conchas, sabendo que, de acordo com a escala de Mohs, a aragonite apresenta uma dureza de 3,5 a 4 em comparação com a calcite que tem dureza mais baixa, de 3,0 (Carral et al. 2023).

A escala utilizada foi a seguinte:

Unha - dureza até 2;

Moeda de 5 cêntimos – revestimento de cobre, com dureza aproximada de 3;

Faca de aço – dureza até 4;

Vidro – dureza até 5.

#### **5.2.3 Teste Químico (Teste com Ácido Clorídrico)**

As conchas foram lavadas em água corrente, até remover todas as impurezas da superfície.

De seguida, as conchas foram passadas por água destilada, para garantir a remoção de minerais e outras impurezas à sua superfície.

Foram colocadas na estufa ventilada, a 60°C, durante 50 min.

Foi pesada cada concha numa balança de precisão.

A concha foi colocada numa placa de Petri de vidro, resistente a ácido.

Foi utilizada uma pipeta de Pasteur para aplicar 2 gotas do ácido clorídrico (1M) diretamente na superfície côncava da concha.

Um cronómetro foi usado para medir o tempo de início da reação e o tempo necessário para a efervescência parar foi registado.

Foi anotada o tempo de reação, em segundos.

Após o teste (1h), a concha foi cuidadosamente lavada com água destilada para remover os resíduos ácidos.

Foram colocadas as conchas na estufa a 60°C, para garantir a secagem.

Foram pesadas de novo as conchas na balança analítica.

### 5.3. RESULTADOS

As espécies ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), amêijoia-amarela (*Macra glauca*) e berbigão (*Cerastoderma edule*), utilizadas neste trabalho, foram identificados a partir do trabalho de Gaspar (1996).

As faces externas e internas das conchas, *M. glauca*, *C. edule* e *C. gigas* são apresentadas na Fig. 5.1.





Figura 5.1: Faces externas e internas das conchas, A) *Mactra glauca*, B) *Cerastoderma edule* do Algarve, C) *Cerastoderma edule* do Óbidos e D) *Crassostrea gigas*.

De acordo com o peso das conchas marinhas, os resultados mostraram que, após a exposição ao ácido, a espécie *C. gigas* apresentou a maior perda de peso, com 3,2 g, seguida por *M. glauca* (0,05 g), *C. edule* do Algarve (0,03 g) e, por último, *C. edule* de Óbidos (0,02 g), encontrando-se os valores médios expresso na Tabela 5.1.

Ao analisar as conchas de cada espécie, observou-se que a espécie *c. Gigas* é a mais sensível ao ácido com uma perda média de peso de  $0,795 \pm 0,757$  g, sendo a concha n.º 8 aquela que

apresentou a maior perda, com 1,88 g. A espécie *m. Glauca* apresentou uma perda média de apenas 0,011±0,010 g, com as conchas n.º 2 e n.º 4 a apresentarem as maiores perdas, ambas com 0,02 g. A *C. edule* do Algarve obteve a menor perda média de 0,004±0,012 g, sendo a concha n.º 7 aquela que apresentou maior perda de 0,02 g. Na *C. edule* de Óbidos foi a que registou menor variação de peso, com uma perda média de 0,001±0,013 g, com a concha n.º 1 a apresentar a maior perda de 0,02 g.

Tabela 5.1.: Média ± desvio padrão do peso de conchas marinhas analisadas, em gramas, antes e depois da adição de ácido clorídrico ( $n = 4$ ).

Zonas	Espécie	Peso inicial	Peso final	Diferença de peso
Algarve	<i>M. glauca</i>	16,153 ±8,033	16,142±8,029	0,011±0,010
Algarve	<i>C. edule</i>	7,045±4,893	7,041±4,886	0,004±0,012
Óbidos	<i>C. edule</i>	4,588±2,050	4,586±2,055	0,001±0,013
Óbidos	<i>C. gigas</i>	54,670±17,381	53,875±17,214	0,795±0,757

Os resultados da análise da espessura confirmam que as conchas marinhas variam em espessura na parte central, borda esquerda e borda direita, conforme indicado na Tabela 5.2. Na espécie *C. gigas*, a concha n.º 5 apresenta a maior espessura na borda esquerda, com 13,50 mm, e na parte central, com 5,00 mm. Na borda direita, a concha n.º 7 possui a maior espessura, com 2,23 mm. Para a espécie *M. glauca*, a concha n.º 1 apresenta a maior espessura na borda esquerda (3,35 mm) e na parte central (2,18 mm). Já na borda direita, a concha n.º 2 possui a maior espessura, com 2,57 mm. Na espécie *C. edule* do Algarve, a concha n.º 8 apresenta a maior espessura tanto na borda esquerda quanto na borda direita, com valores de 1,42 mm e 1,41 mm, respetivamente. Na parte central, a concha n.º 7 é a que possui a maior espessura. Por fim, na espécie *C. edule* de Óbidos, a concha n.º 1 apresenta a maior espessura nas bordas esquerda e direita, com valores de 2,00 mm e 2,11 mm, respetivamente. Já a concha n.º 3 desta espécie destaca-se com a maior espessura na parte central.

Tabela 5.2.: Média ± desvio padrão da espessura das conchas marinhas analisadas em diferentes pontos, em milímetros ( $n = 4$ ).

Local	Espécie	Parte central	Borda esquerdo	Borda direito
Algarve	<i>M. glauca</i>	1,500±0,561	2,365±1,157	2,390±0,223
Algarve	<i>C. edule</i>	0,673±0,545	0,770±0,498	0,860±0,421
Óbidos	<i>C. edule</i>	1,775±0,344	1,828±0,152	1,650±0,344
Óbidos	<i>C. gigas</i>	2,405±2,074	8,958±4,097	1,210±0,900

Foi observada a efervescência que se deve à libertação de dióxido de carbono na forma de bolhas, que indicava a dissolução de carbonato de cálcio, um dos principais componentes das conchas. Isso ocorre porque o ácido clorídrico reage com o carbonato de cálcio, libertando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), conforme se pode observar na reação seguinte:  

$$\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \uparrow$$

De acordo com o tempo de reação (Tabela 5.3), os resultados indicam que a espécie *C. gigas* apresentou o maior tempo de reação, seguida por *C. edule* (Algarve), *M. glauca* e *C. edule* (Óbidos), que exibiram o menor tempo de reação. No que diz respeito à velocidade da reação, a espécie *C. gigas* apresentou reação rápida em todas as conchas analisadas. Por outro lado, as espécies *M. glauca* e *C. edule* (Algarve) apresentaram reação rápida apenas nas conchas n.º 4 e n.º 8, respetivamente. Já *C. edule* (Óbidos) apresentou reação lenta em todas as suas conchas, sugerindo maior resistência ao ataque ácido.

Tabela 5.3.: Média ± desvio padrão do tempo de reação da concha ao ácido clorídrico, em segundos (*n* = 4).

Local	Espécie	Tempo de reação	Reação rápida/lenta
Algarve	<i>M. glauca</i>	80,00 ± 14,33	Lenta
Algarve	<i>C. edule</i>	66,00 ± 21,77	Lenta
Óbidos	<i>C. edule</i>	56,25 ± 07,50	Lenta
Óbidos	<i>C. gigas</i>	95,25 ± 36,51	Rápida

Com relação à dureza das conchas, avaliada por meio da escala de Mohs modificada, os resultados obtidos indicam que *C. edule*, proveniente de Óbidos, apresentou a maior dureza,

com valores superiores na parte externa em comparação com todas as demais espécies analisadas (Tabela 5.4). Por outro lado, *C. gigas* apresentou a menor dureza, tanto na parte interna quanto na parte externa da concha.

Tabela 5.4.: Média  $\pm$  desvio padrão de dureza das conchas marinhas utilizando escala de Mohs ( $n = 4$ ).

Local	Espécie	Dureza interna	Dureza externa
Algarve	<i>M. glauca</i>	1	1
Algarve	<i>C. edule</i>	3	3,5 $\pm$ 0,577
Óbidos	<i>C. edule</i>	3	5
Óbidos	<i>C. gigas</i>	3	4,25 $\pm$ 0,957

#### 5.4. DISCUSSÃO

Os resultados revelam diferenças entre os valores iniciais (antes do tratamento ácido) e finais (após o tratamento ácido) para as conchas das seguintes espécies: *C. gigas*, com 3,20 g; *M. glauca*, com 0,05 g; *C. edule*, tanto a do Algarve como o da Lagoa de Óbidos, com 0,02 g. Nesse contexto, as conchas da espécie *C. gigas* mostraram uma diferença significativa entre os valores inicial e final após o tratamento ácido. As conchas das demais espécies apresentaram valores que indicam pouca ou nenhuma diferença entre os valores inicial e final.

A análise da dureza das diferentes conchas marinhas revela que a espécie *C. gigas* apresenta também a menor dureza, ou seja, maior fragilidade, uma vez que, na escala utilizada, a unha foi capaz de riscar sua concha, tanto na parte interna quanto na parte externa. Esse resultado confirma que essa espécie é mais suscetível a ambientes *C. edule*, provenientes do Algarve, apresentaram maior dureza em comparação com *C. gigas*. Já *C. edule* de Óbidos, na maior escala utilizada (vidro), teve apenas a parte interna riscada, indicando que suas conchas apresentam dureza muito superior e, conseqüentemente, maior resistência à acidificação.

Resultados semelhantes foram relatados por Nithiyaa et al. (2021) em um estudo sobre o efeito da água do mar acidificada, durante 7 dias, nas características das conchas do bivalve *Tegillarca granosa*. Os dados desse estudo foram apresentados como uma razão entre o valor final e o valor inicial. Uma razão próxima ou igual a 1 indicava pouca ou nenhuma diferença entre o valor

inicial (antes do tratamento ácido) e o valor final (após o tratamento ácido). Em contrapartida, uma razão mais baixa do que 1 refletia uma diferença significativa entre os valores inicial e final após o tratamento ácido, tendo registado uma razão baixa, indicando uma grande diferença entre o valor inicial e final para o peso e densidade das conchas do bivalve. Em ambientes com alta acidez, o carbonato de cálcio tende a dissolver-se mais facilmente, enfraquecendo as conchas e reduzindo a sua resistência. Conchas marinhas mais duras são menos suscetíveis à dissolução em ácidos fortes, enquanto conchas mais frágeis se dissolvem com maior facilidade, como registado no presente estudo. De igual forma, Waldbusser et al. (2011), analisaram o efeito do pH na redução do peso das conchas de ostra (*Crassostrea virginica*). Estes autores verificaram que tanto o pH como o tipo de concha tiveram efeitos significativos na taxa de dissolução da concha, com um pH mais baixo a aumentar a taxa de dissolução.

Em relação à espessura, as conchas marinhas variam conforme a espécie e o tamanho, dependendo das diferentes partes analisadas. Os resultados mostraram que as conchas da espécie *C. gigas* apresentam maior espessura na parte central e na borda esquerda. Por outro lado, na borda direita, as conchas da espécie *M. glauca* apresentam as maiores espessuras. De acordo com o estudo realizado por Bamigboye et al. (2021), os resultados encontrados foram bastante semelhantes, com a concha de berbigão apresentando uma espessura menor, enquanto a concha de ostra teve o maior valor no teste.

Durante o ensaio de reação com ácido clorídrico, as conchas da espécie *C. gigas* apresentaram o maior tempo de reação, evidenciando maior vulnerabilidade ao ácido. Essa espécie foi rapidamente atacada, o que demonstra sua baixa resistência química. Por outro lado, as conchas das espécies *M. glauca* e *C. edule*, provenientes do Algarve, apresentaram uma reação mais lenta, em razão de sua menor reatividade com o ácido clorídrico. Em especial, as conchas da espécie *C. edule* demonstraram uma interação ainda mais lenta, sugerindo maior resistência à ação do ácido, o que indica boa integridade estrutural e maior dureza. Estes resultados eram os esperados, sendo inversamente proporcionais à dureza da concha de cada espécie.

## **5.5. APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

As conchas marinhas, especialmente as de moluscos bivalves, podem servir como bioindicadores, ajudando a identificar áreas costeiras em risco e fornecendo dados essenciais para políticas públicas e estratégias de conservação marinha. A dureza das conchas, avaliada neste estudo, pode ser utilizada para investigar como a acidificação oceânica afeta a resistência

física das conchas ao longo do tempo. Em particular, as conchas de espécies vulneráveis, como *Crassostrea gigas*, podem ser monitorizadas para prever o impacto das mudanças no ambiente marinho, permitindo a adoção de ações para proteger a biodiversidade e as economias locais dependentes da pesca. Além disso, a análise da dureza pode ser aplicada para otimizar práticas de cultivo, ajustando as condições ambientais para garantir conchas mais fortes e resistentes, minimizando perdas causadas pela dissolução prematura. A monitorização contínua da dureza das conchas também pode contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas, melhorando o desempenho destas espécies em regiões suscetíveis à acidificação oceânica.

Poderão ser utilizados diferentes moluscos, que respondem de maneiras distintas às mudanças ambientais, e uma análise mais abrangente poderá fornecer uma compreensão mais detalhada dos impactos da acidificação em várias espécies. Além disso, no futuro, poderão ser utilizadas tecnologias avançadas de imagem, como tomografia computadorizada (TC) ou microscopia eletrônica de varredura (SEM), que permitiriam uma análise mais precisa da microestrutura das conchas, fornecendo dados mais detalhados sobre sua resistência e comportamento perante as mudanças ambientais.

#### QUESTÕES PARA DEBATE EM SALA DE AULA

1. Qual espécie apresentou maior sensibilidade à acidificação? O que isso pode indicar sobre seu habitat natural ou sua composição química?
2. A dureza da concha está diretamente relacionada com a sua resistência ao ácido? Justifique com base nos dados.
3. Que relação você percebe entre a espessura da concha e sua perda de massa após o teste com ácido?
4. Com base nos resultados, qual concha demonstrou maior resistência à acidificação? O que poderia explicar isso?
5. Por que há efervescência quando se coloca ácido clorídrico sobre a concha? Qual reação química ocorre?
6. Como você explicaria a utilidade da escala de Mohs no estudo das conchas marinhas?

## 6 – PROTOCOLO V - EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS DE CIANOBACTÉRIAS E MACROALGAS MARINHAS

---

### 6.1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, os oceanos têm representado uma fonte inesgotável de riquezas e mistérios para a humanidade. Desde os tempos mais remotos, as pessoas recorreram a esse vasto ambiente para navegar em busca de alimento e novas terras. No entanto, a exploração do fundo do mar só teve início por volta do século XIX e, apenas nas últimas décadas, os avanços científicos começaram a revelar todo o potencial desse recurso. Muitos cientistas defendem a ideia de que os oceanos abrigam uma biodiversidade ainda maior do que os continentes, pois grande parte da vida marinha permanece desconhecida e os oceanos possuem uma capacidade até 100 vezes superior para sustentar a existência de organismos. Entre os principais exemplos que reforçam essa perspectiva estão os recifes de coral, considerados os maiores reservatórios de biodiversidade marinha, devido à alta concentração de espécies por unidade de área (Costa, R. C. C, 2016).

O globo terrestre é formado, em sua maior parte, por água doce ou marinha. Dentro dessa vasta "solução", encontram-se diversos organismos, incluindo aqueles essenciais para a manutenção do equilíbrio do ecossistema aquático, como as algas. No ambiente marinho, as macroalgas representam um dos grupos mais diversos entre os organismos fotossintetizantes, com aproximadamente 32.000 espécies identificadas (de Almeida et al. 2007).

#### 6.1.1. As algas marinhas e sua importância ecológica, alimentar e cosmética

As algas são organismos capazes de realizar a fotossíntese, embora não possuam folhas, raízes ou tecidos vasculares. Elas desempenham um papel ecológico essencial, semelhante ao das plantas terrestres, atuando como produtores primários. Predominantemente aquáticas, podem ser encontrados em ambientes marinhos, águas estuarinas, dulcícolas e superfícies húmidas. A sua distribuição é diretamente influenciada por fatores químicos e físicos, como temperatura, salinidade da água, disponibilidade de luz e correntes oceânicas. Nesses ecossistemas aquáticos, as algas absorvem a energia solar e a transformam em biomassa, desempenhando um papel fundamental na mineralização e no ciclo dos elementos químicos. Por esse motivo, são

consideradas o verdadeiro pulmão do planeta, pois, através da fotossíntese, geram mais oxigênio do que consomem durante a respiração, libertando o excesso para o ambiente. (Costa, R. C. C, 2016).

As algas marinhas têm sido utilizadas na alimentação humana há séculos, especialmente em países asiáticos como China, Japão, Coreia e Filipinas. Nessas regiões, as espécies mais consumidas incluem *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* e *Porphyra spp.* Assim como outros alimentos de origem vegetal, as algas são uma fonte natural rica em diversos nutrientes, incluindo vitaminas (Sousa, 2005). Os extratos de algas utilizados na produção de xampus, sabonetes e cremes possuem propriedades hidratantes, ajudando a manter o equilíbrio natural da pele e do cabelo, deixando-os mais macios e sedosos. Os cosméticos à base de algas, formam uma película protetora que previne o ressecamento, a poluição e o excesso de oleosidade. Além disso, por possuírem uma película lipofóbica, ou seja, que repele a gordura, proporcionam um efeito notável na pele, não apenas pela suavidade que conferem, mas também pela limpeza e hidratação profunda que oferecem (de Almeida et al. 2007). As macroalgas marinhas apresentam um grande potencial biotecnológico, sendo alvo de pesquisas voltadas para o combate a microrganismos oportunistas que afetam os cultivos aquáticos e geram prejuízos econômicos em escala global (Silva, 2012).

Na Europa, o consumo é predominantemente voltado para espécies como *Palmaria palmata*, *Porphyra spp.*, *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus*. França foi o primeiro país europeu a estabelecer uma regulamentação específica para o uso de algas na alimentação humana. Essas normas determinam que as algas devem atender tanto a critérios industriais e técnicos quanto a padrões de segurança alimentar, incluindo limites máximos permitidos para minerais tóxicos e determinadas bactérias (Sousa, 2005).

### **6.1.2. Classificação das algas**

Atualmente a classificação das algas encontra-se em revisão, uma vez que os reinos identificados por Whittaker foram sendo substituído por sistemas mais baseados em relações evolutivas reais, reveladas principalmente por análises genéticas. Assim os antigos reinos Monera, Protista e Plantae foram sendo substituídos pelas Eubacteria, pelos Stramenopila, Rhizaria e Alveolata, enquanto as plantas estão agora classificadas como Archaeplastida (Gololobova & Belyakova, 2022). As cianobactérias, também chamadas algas azuis, pertencem ao reino Eubacteria e são organismos procariontes (não possuem membrana nuclear) e autotróficos (capazes de produzir

seu próprio alimento). Podem ser encontradas em diversos ambientes, desde que apresentem umidade, e desempenham o papel de "espécies pioneiras" devido à sua baixa exigência nutricional, à capacidade de realizar fotossíntese e à habilidade de utilizar o nitrogênio presente na atmosfera (Vidotti & Rollemberg, 2004). A inclusão de microalgas na alimentação tem se tornado cada vez mais comum e pode ser facilmente encontrada em lojas especializadas em produtos naturais. Dentre elas, a *Arthrospira* sp., conhecida comercialmente como Spirulina, destaca-se como uma das fontes proteicas mais ricas, podendo conter até 70% de proteína na matéria seca, além de altos níveis de ferro e grandes quantidades de compostos bioativos, como  $\beta$ -caroteno, vitaminas do complexo B e ácidos gordos essenciais e polinsaturados. Devido à sua composição, diversos estudos relatam os efeitos nutracêuticos do consumo regular da Spirulina, incluindo melhoria do sistema imunológico, propriedades anti-inflamatórias e anti-hipertensivas, atividades antilipídicas e hipoglicemiantes, controle do apetite e aumento da resistência à fadiga mental e física (Cerqueira et al. 2025).

Os organismos do antigo reino Protista são, em sua maioria, unicelulares, embora existam formas pluricelulares de organização simples. Podem ser autotróficos, produzindo seu próprio alimento, ou heterotróficos, necessitando de matéria orgânica para se alimentarem. As suas células são eucariontes, ou seja, possuem núcleo envolto por membrana e organelos membranares. São seres relativamente simples, representando o primeiro grupo a apresentar mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, geralmente com um único núcleo. As algas pertencentes a esse reino possuem pigmentos como clorofilas, carotenos e xantofilas, organizados em organelos chamados plastos, que possibilitam a realização da fotossíntese, destacando-se as algas castanhas (Vidotti & Rollemberg, 2004).

Filo Ochrophyta, classe Phaeophyceae -: Composto pelas algas castanhas, organismos pluricelulares predominantemente marinhos, sendo mais frequentes em águas frias. Podem viver fixos em substratos ou flutuar, formando vastas florestas submersas. As algas castanhas são as maiores entre as algas, podendo ultrapassar 50 metros de comprimento. Contêm os pigmentos fucoxantina, clorofilas a e c, além de carotenoides, e armazenam óleos e laminarina (um polissacarídeo) como substâncias de reserva (Vidotti & Rollemberg, 2004).

No reino Archaeplastida, estão presentes organismos pluricelulares, eucariontes e autotróficos, com as seguintes principais classificações:

Filo Chlorophyta: Composto pelas algas verdes, amplamente distribuídas nos ambientes aquáticos, onde desempenham um papel fundamental no fitoplâncton. Essas algas são responsáveis por grande parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta por meio da fotossíntese. Podem ser encontradas tanto em água doce quanto salgada, além de solos húmidos, muros e troncos. Algumas espécies estabelecem relações de mutualismo com fungos, formando líquenes. Acumulam amido dentro das suas células e possuem os pigmentos clorofilas **a** e **b**, carotenos e xantofilas. A presença das clorofilas **a** e **b** sugere que as algas verdes possam ter sido ancestrais das plantas terrestres, já que compartilham esses pigmentos com elas (Vidotti & Rollemberg, 2004). As macroalgas verdes do gênero *Ulva* (família Ulvaceae) são amplamente empregadas em diversas áreas, incluindo suplementos alimentares e aplicações biomédicas. Essa alga marinha é também cultivada como fonte de fibras naturais, utilizada na produção de biocombustíveis e incorporada como suplemento na indústria farmacêutica (Cindana Mo’o et al, 2020).

Filo Rhodophyta: Composto pelas algas vermelhas, que são quase exclusivamente pluricelulares e marinhas, sendo mais comuns em mares tropicais e subtropicais, onde vivem fixas a um substrato. A sua principal característica é a presença do pigmento ficoeritrina, responsável por sua coloração avermelhada. Essas algas possuem clorofilas **a**, além de carotenoides, e armazenam amido florídeo como substância de reserva (Vidotti & Rollemberg, 2004).

### **6.1.3. Pigmentos de algas**

As clorofilas são pigmentos essenciais para a fotossíntese, utilizados por organismos autotróficos, como plantas e algas, para capturar a luz e, junto com a fixação do dióxido de carbono, sintetizar os carboidratos indispensáveis ao seu crescimento. Em macroalgas verdes, os tipos mais comuns de clorofila encontrados são **a** e **b**. Além de serem utilizadas como corantes naturais na indústria alimentar para conferir cor a alimentos e bebidas, as clorofilas e seus derivados também têm despertado interesse devido a outras propriedades relevantes, como as suas atividades antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (Martins et al 2021). As atividades antioxidantes são amplamente associadas a extratos à base de álcool. A *Ulva* contém compostos fenólicos, clorofilas e carotenoides, que atuam como eliminadores eficazes de radicais livres responsáveis pelo stress oxidativo. Para a extração de pigmentos e compostos fenólicos, é comum o uso de soluções aquosas contendo metanol, etanol ou acetona (McCauley et al 2018).

A ficocianina é um pigmento natural de tonalidade azul-forte e solúvel em água, amplamente utilizada em diversos setores, incluindo a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (Gorgich et al. 2020). A viabilidade econômica da produção de ficocianina está diretamente relacionada com o custo da biomassa. Assim, a utilização de um meio de cultivo de baixo custo, com a menor quantidade possível de produtos químicos sintéticos custosos, pode contribuir para a redução dos custos de produção (Sandeep et al. 2015)

A ficoeritrina, de cor rosada, é o principal pigmento que permitem às algas vermelhas crescerem em abundância em águas profundas, pois possuem um espectro de absorção de luz altamente eficiente, variando de 450 nm a 570 nm. Por essa razão, as algas marinhas vermelhas são frequentemente encontradas em áreas mais profundas da região intertidal, em comparação com as algas verdes e castanhas (Costa, R. C. C, 2016).

Os carotenoides são pigmentos de tonalidade vermelha, alaranjada ou amarela, encontrados nas membranas dos tilacoides. Eles são insolúveis em água, mas se dissolvem em solventes orgânicos e óleos. Sendo precursores de substâncias essenciais para a vida, como a vitamina A, a sua obtenção ocorre por meio da alimentação (Costa, R. C. C, 2016). Os carotenoides presentes nas algas marinhas possuem uma distribuição variada. As Rhodophyta geralmente contêm  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, além de seus derivados hidroxilados, luteína e zeaxantina. As Phaeophyceae têm a fucoxantina como principal pigmento, mas também apresentam  $\beta$ -caroteno e violaxantina. Já as Chlorophyta costumam conter anteraxantina, violaxantina e neoxantina, todas derivadas do  $\beta$ -caroteno (Sousa, 2005).

O presente trabalho tem como objetivo a extração e separação, por cromatografia em papel, de pigmentos fotossintéticos de cianobactérias e macroalgas marinhas. De forma simples, permite que os estudantes observem a grande diversidade de pigmentos presentes nessas algas.

## **6.2. METODOLOGIA**

O trabalho divide-se em duas partes:

Extração de Pigmentos: Na primeira parte, proceder-se-á à extração dos pigmentos, tanto solúveis quanto insolúveis, utilizando uma solução aquosa (soro fisiológico). Este processo visa separar os pigmentos presentes na amostra, permitindo a análise dos compostos individuais.

Separação dos Pigmentos por Cromatografia: Na segunda parte, os pigmentos extraídos serão separados utilizando a técnica de cromatografia em papel. A separação ocorrerá com base nas diferenças de polaridade dos pigmentos, o que permitirá a identificação e o estudo das características de cada substância presente.

### **6.2.1. Materiais necessários**

#### *6.2.1.1. Material biológico*

Spirulina (cianobactéria do género *Arthrospira* sp.), em pó;

Alga vermelha (*Plocamium cartilagineum*), congelada;

Alga verde (*Ulva* sp.), congelada;

Alga castanha (*Sargassum vulgare*), congelada.

#### *6.2.1.2. Material de laboratório*

8 gobelets de 100 mL;

8 gobelets de 250 mL;

Almofariz e pilão;

Balança analítica;

Espátula;

Faca;

Papel de alumínio;

Soro fisiológico;

Papel de filtro ou filtros de café;

Funil;

Etanol 70% (ou acetona);

Papel de cromatografia;

4 tubos de ensaio longos;

Suporte de tubo de ensaio.

### **6.2.2. Procedimento**

#### *6.2.2.1. Extração hidrofílica*

Pesaram-se 1g de cada alga e triturou-se a biomassa algal em pedaços pequenos, com um almofariz. Adicionou-se a cada alga 10 mL de soro fisiológico. Macerou-se com o pilão para

permitir a libertação do pigmento, pelo menos durante 5 minutos. Adicionaram-se mais 10 mL de soro fisiológico.

Identificar 4 gobelets e transferiu-se para cada gobelet a alga macerada, tapou-se com papel de alumínio e aguardou-se 30 minutos.

Colocou-se um funil com um papel de filtro, sobre um gobelet de 250 mL e verteu-se o conteúdo do primeiro gobelet sobre o funil com o filtro e aguardou-se. O sobrenadante contém o extrato dos pigmentos solúveis em água.

Repetir o processo para a alga vermelha, a verde e a castanha.

#### *6.2.2.2. Extração hidrofóbica*

Triturou-se a biomassa algal em pedaços pequenos, com uma liquidificadora ou num almofariz.

De seguida pesou-se 1g de cada alga, tendo sido colocado num almofariz. Adicionaram-se 10 mL de acetona a 70% e macerou-se com o pilão para permitir a libertação do pigmento, pelo menos durante 5 minutos. Adicionaram-se mais 10 mL de acetona a 70%.

Transferiu-se para um gobelet, tapou-se com papel de alumínio e aguardaram-se 30 minutos.

Colocou-se um funil com um papel de filtro sobre um segundo gobelet e verteu-se o conteúdo do primeiro gobelet sobre o funil com o filtro e aguardou-se até todo o líquido ter sido transferido.

Repetiu-se o processo para as outras 3 algas.

O sobrenadante contém, sobretudo, o extrato dos pigmentos hidrofóbicos.

#### *6.2.2.3. Cromatografia em papel*

Prepararam-se 4 pedaços de papel de filtro, com cerca de 10 cm de largura e 5 cm de altura que foram dobrados ao meio.

Verteu-se todo o extrato hidrofóbico de Spirulina, extraído com acetona, numa caixa de Petri e inseriu-se o pedaço de papel na caixa de Petri.

Aguardaram-se pelo menos 15 minutos para permitir a migração do eluente no papel.

Repetiu-se o processo para as outras três espécies de alga.

Observaram-se as diferentes cores a separarem-se que corresponde a diferentes pigmentos fotossintéticos.

### 6.3. RESULTADOS

De acordo com o resultado da extração hidrofílica, foram obtidas quatro cores distintas, representadas na figura 6.1.

O extrato de *Plocamium cartilagineum* é rosado devido à predominância da ficoeritrina, que é altamente solúvel em água.

O extrato de *Sargassum vulgare* apresenta coloração amarelada, indicando a presença da fucoxantina como principal pigmento, além de outros compostos não relacionados, extraídos durante a maceração.

O extrato de Spirulina (cianobactéria do género *Arthrospira sp.*) é azul devido à predominância da ficocianina, que é também altamente solúvel em água.

O extrato de *Ulva sp.* é verde, devido à presença das clorofilas, resultante da maceração inicial.



Figura 6.1: Extrato hidrofílica de algas marinhas fotossintéticos: *P. cartilagineum*, *S. vulgare*, *Arthrospira sp.*, e *Ulva sp.*

Para a extração hidrofóbica, o resultado apresenta os quatro extratos de acetona em tonalidades de verde distintas, indicando a presença de clorofilas em diferentes concentrações (figura 6.2).

O extrato de *Arthrospira* sp. é verde devido à alta concentração de clorofila, um pigmento insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos.

O extrato da alga *Ulva* sp. também é verde, demonstrando uma elevada concentração de clorofilas a e b, além da presença de carotenoides.

Na alga *Sargassum vulgare*, a coloração amarela da fucoxantina está mascarada pela alta concentração de clorofilas a e c.

O extrato da alga *Plocamium cartilagineum* apresenta uma coloração muito menos intensa, devido à menor quantidade de clorofila a.



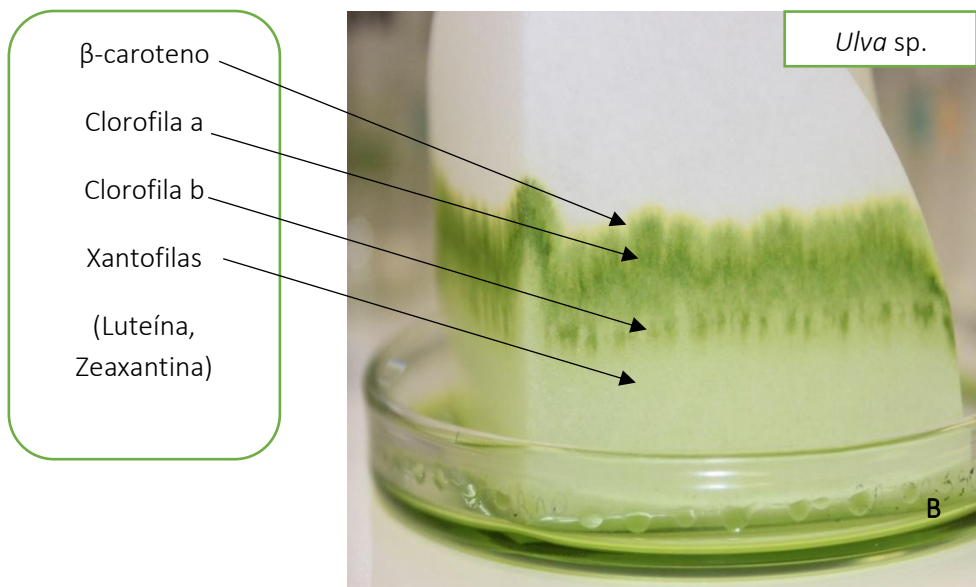
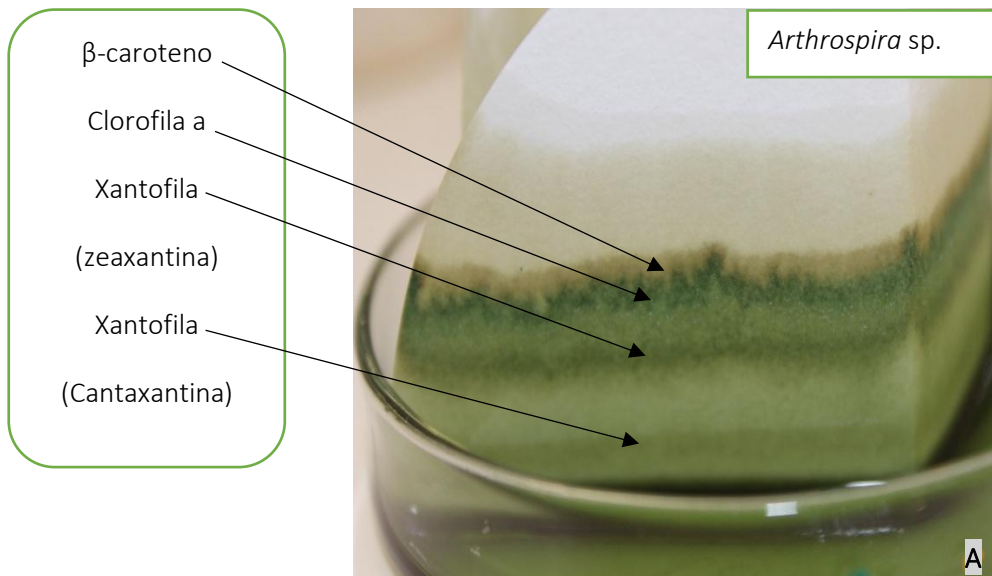
Figura 6.2: Extrato hidrofóbica de algas marinhas fotossintéticos: *P. cartilagineum*, *S. vulgare*, *Arthrospira* sp., e *Ulva* sp.

Na cromatografia em papel, os pigmentos foram separados de acordo com suas polaridades. O cromatograma característico apresenta faixas de cores e tons diferentes, mais ou menos diferenciados. A maior intensidade de cor indica uma maior concentração desse pigmento.

Neste caso, o extrato mais concentrado é o da *Arthrospira* sp., enquanto o menos concentrado é o da alga *Plocamium cartilagineum*. O pigmento mais hidrofóbico de todos é o  $\beta$ -caroteno, que forma uma faixa amarela na posição superior de todos os extratos das quatro espécies de algas analisadas.

A seguir, observa-se uma faixa verde-escura correspondente à clorofila  $a$ . Abaixo dessa faixa, há grandes variações entre as diferentes espécies. Na *P. cartilagineum*, o extrato estava pouco

concentrado, de modo que as xantofilas não são visíveis. Na *Arthrospira* sp., aparecem várias faixas correspondentes a diferentes xantofilas pouco concentradas, como a zeaxantina e cantaxantina. Na *Ulva* sp., observa-se uma segunda faixa verde correspondente à clorofila b e também uma faixa amarelada de xantofilas, com destaque para a luteína e zeaxantina. Já na alga *S. vulgare*, observa-se também uma faixa verde, mas referente à clorofila c; abaixo dela, há uma coloração amarelada da fucoxantina, que é uma xantofila característica desse grupo de algas.



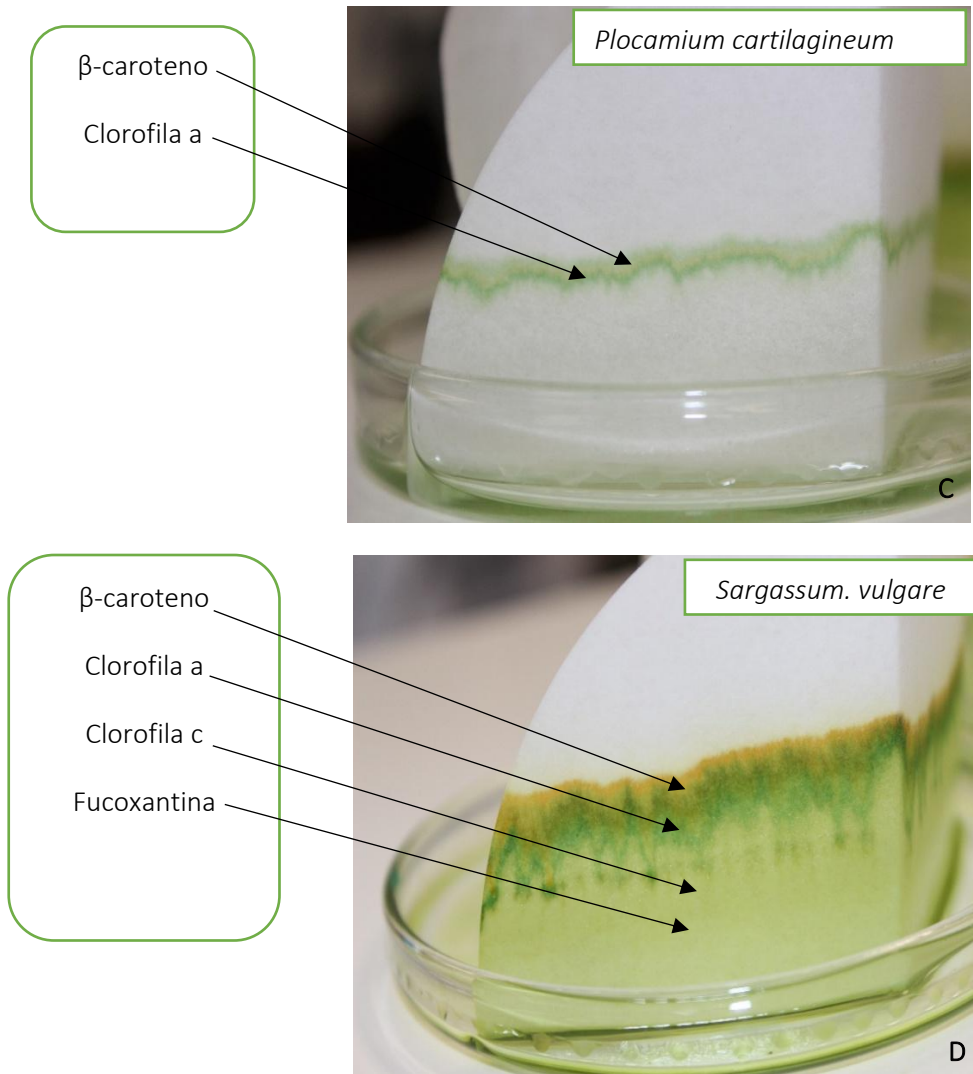


Figura 6.3: Cromatografia em papel dos pigmentos extraídos de a) *Arthrospira* sp.; b) *Ulva* sp., c) *Plocamium cartilagineum*, d) *Sargassum vulgare*.

#### 6.4. DISCUSSÃO

Os pigmentos hidrofílicos podem ser distinguidos por suas cores, pois são solúveis em solventes polares. O soro fisiológico é uma solução aquosa salina (NaCl em água), altamente polar, com afinidade por compostos hidrossolúveis. Numa extração com soro fisiológico, aparecem pigmentos como as ficobilinas (por exemplo ficoeritrina e ficocianina), revelando cores variadas como azul, vermelho ou roxo, dependendo da alga. Para além disso, esses extratos contêm ainda

outros pigmentos, tais como, fucoxantina, e clorofilas, cujos teores variam conforme a natureza de cada organismo.

Já para os pigmentos hidrofóbicos, os extratos preparados com acetona apresentam coloração verde com tons variados, evidenciando a presença de clorofila a, em todas as amostras. A clorofila, especialmente clorofila a, é o pigmento mais abundante nas algas (e plantas em geral), e apresenta uma cor verde intensa, refletindo a luz verde e absorvendo a luz azul e vermelha. Na maioria das algas, mesmo que existam outros pigmentos (como carotenoides ou ficobilinas), a clorofila tende a ser dominante na extração com acetona, devido à polaridade deste solvente (Simon e Helliwell, 1998). Assim, o que se extrai com acetona é principalmente o que ela consegue dissolver — clorofilas e quantidades menores de carotenos, de coloração verde ou amarelada, respetivamente. A cor verde é visível porque a clorofila é o pigmento mais abundante nas algas e o mais eficientemente extraído pela acetona. Outros pigmentos estão presentes, mas ou são menos concentrados ou não são solúveis nesse solvente.

Numa segunda fase, os pigmentos hidrofóbicos foram separados por cromatografia em papel, de acordo com suas polaridades. Os pigmentos mais apolares, como o  $\beta$ -caroteno e a clorofila a, tendem a permanecer na parte superior do papel, enquanto os mais polares, como a xantofila e a fucoxantina, ficam na parte inferior. De acordo com Silva et al. (2013), a separação dos pigmentos clorofilados e carotenoides ocorre devido à sua composição química, que pode ser polar ou apolar. Assim, os carotenoides, por serem apolares, deslocam-se mais rapidamente pelo papel e apresentam coloração mais intensa, enquanto os pigmentos clorofilados, por possuírem maior polaridade, movem-se mais lentamente.

Os carotenos, como o  $\beta$ -caroteno, são hidrocarbonetos apolares cujas interações predominantes são as forças de London, resultantes da atração entre dipolos temporários. Eles apresentam baixa afinidade com a fase estacionária e maior compatibilidade com a fase móvel empregada neste experimento, composta por hexano com 5% de acetona. Por essa razão, esses hidrocarbonetos são facilmente eluídos pela fase móvel e, no processo cromatográfico, deslocam-se mais rapidamente, afastando-se consideravelmente do ponto onde a amostra foi aplicada (Ribeiro & Nunes, 2008).

O  $\beta$ -caroteno apresenta cor alaranjada, a clorofila a, cor verde-escura, a clorofila b, verde-clara, e a clorofila c, verde-amarelada. A xantofila tem cor amarela a vermelha e é um tipo de carotenoide presente em plantas, algas e alguns organismos fotossintéticos, auxiliando na

absorção de luz e na proteção contra a oxidação. Um exemplo comum de xantofila é a luteína, encontrada em folhas verdes e no milho, bem como nas algas vermelhas. A fucoxantina possui cor castanha-amarelada e é um tipo de carotenoide encontrado principalmente em algas castanhas. Sua coloração contribui para a tonalidade característica dessas algas e ajuda na absorção de luz em ambientes aquáticos.

Geralmente, as algas verdes e vermelhas possuem tanto  $\alpha$ -caroteno quanto  $\beta$ -caroteno, além de seus derivados hidroxilados, como luteína e zeaxantina, respectivamente. Além desses pigmentos, as clorófitas costumam conter também violaxantina, anteraxantina e neoxantina. Espécies de algas vermelhas do gênero *Porphyra* apresentam quantidades de  $\beta$ -caroteno mais altas do que vegetais verdes e amarelos (Sousa, 2005). As quantidades de  $\beta$ -caroteno obtidas neste trabalho de separação de pigmentos por cromatografia em papel apresentam pouca diferença em relação aos resultados do estudo de Sousa M. B. D. (2005). A quantidade de  $\beta$ -caroteno é maior do que a dos pigmentos verdes e amarelos, não apenas na alga *P. cartilagineum*, mas em todos os extratos das três (3) espécies de algas analisadas.

## **6.5. APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

A extração de pigmentos fotossintéticos de cianobactérias e macroalgas marinhas tem diversas aplicações em indústrias como a farmacêutica, alimentar, cosmética e biotecnológica. Os carotenoides atuam na prevenção do stress oxidativo e na síntese de vitamina A, essencial para a saúde ocular e para o sistema imunológico. Os pigmentos extraídos de macroalgas são utilizados como corantes naturais, substituindo corantes sintéticos prejudiciais à saúde. Além disso, os carotenoides e as clorofilas são empregados em suplementos nutricionais devido às suas propriedades antioxidantes e protetoras. Esses pigmentos também são incorporados em produtos cosméticos devido à sua capacidade de proteção contra radicais livres e raios UV. O uso de pigmentos naturais na fotossíntese artificial representa uma área promissora para a captação de energia solar.

O desenvolvimento de técnicas mais eficientes, ecológicas e economicamente viáveis para a extração de pigmentos, como o uso de solventes verdes e nanotecnologia, é fundamental para otimizar os processos industriais. Além disso, a manipulação genética pode aumentar a produção de pigmentos em algas e cianobactérias, tornando o processo mais eficiente. Os pigmentos fotossintéticos também apresentam potencial aplicação na engenharia de tecidos e em terapias regenerativas. Por fim, a valorização dos pigmentos de algas em substituição a

ingredientes sintéticos favorece uma indústria mais sustentável e alinhada aos princípios da economia circular.

#### QUESTÕES PARA DEBATE EM SALA DE AULA

1. Qual foi o organismo com extrato mais colorido?
2. Qual é principal diferença entre extrações hidrofílicas e hidrofóbicas?
3. Por que diferentes espécies de algas apresentam colorações distintas nos extratos aquosos?
4. Explique por que a cromatografia em papel é uma técnica eficaz na separação dos pigmentos fotossintéticos?
5. Qual foi pigmento mais hidrofóbico detectado na cromatografia foi?

## 7 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL VI - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIORREMEDIAÇÃO DO MEXILHÃO EM ÁGUAS DE PURGA DE UMA AQUACULTURA DE CORVINA

---

### 7.1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial impõe desafios ao desenvolvimento sustentável, pois intensifica a procura por recursos que já estão no limite. A aquacultura pode desempenhar um papel significativo no equilíbrio entre a necessidade de alimentos e os sistemas de produção. Trata-se da prática de cultivar organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos e algas, com o objetivo de suprir a procura alimentar humana ou atender a outros propósitos não alimentares. Essa atividade envolve a intervenção humana no processo de cultivo, incluindo o controle de fatores ambientais, como a temperatura e a salinidade da água, além do fornecimento de ração e da adoção de medidas de proteção contra predadores (de Abreu et al. 2023). A aquacultura, contudo, pode ser uma atividade com elevado impacto ambiental, dada, por exemplo, a libertação de efluentes ricos em nutrientes que podem causar a eutrofização e a libertação de matéria orgânica e sólidos em suspensão, que aumentam a turbidez dos corpos de água naturais (Valenti, 2002).

A biorremediação surgiu como uma alternativa tecnológica para recuperar áreas afetadas por poluentes orgânicos. Para que esse processo ocorra de maneira eficiente, é fundamental a presença de microrganismos capazes de catalisar as reações químicas envolvidas na degradação desses compostos. Além disso, é indispensável que os contaminantes estejam acessíveis tanto para esses microrganismos quanto para as enzimas que eles produzem (Chinellato, 2023). Esse método biotecnológico, voltado para a recuperação ambiental, tem sido amplamente estudado e recomendado pela comunidade científica como uma solução eficaz para o tratamento de áreas contaminadas, incluindo solos, águas subterrâneas e superficiais, bem como efluentes industriais (de Abreu et al., 2023).

As técnicas de biorremediação podem ser aplicadas diretamente no local da contaminação (*in situ*) ou em um ambiente controlado (*ex situ*), abrangendo diversos métodos, como biorremediação passiva, bioventilação, *landfarming*, compostagem, bioamplificação e

bioestimulação. A biorremediação *ex situ* consiste na remoção física do material contaminado, como solos ou sedimentos, para posterior tratamento em condições controladas, utilizando biorreatores, biopilhas ou lagoas. Além disso, pode incluir métodos físico-químicos, como lavagem do solo, inativação química com oxidantes, como permanganato de potássio e peróxido de hidrogénio, ou até mesmo incineração. No entanto, essas abordagens apresentam diversas limitações e custos elevados (Chinellato, 2023).

A biorremediação *in situ*, que utiliza microrganismos para reduzir a concentração de poluentes e remover compostos tóxicos, é considerada uma alternativa promissora. Essa técnica apresenta vantagens significativas, como menor custo operacional, baixo consumo de energia e ausência de resíduos secundários, tornando-se uma opção sustentável para a recuperação ambiental. A eficiência e a rapidez do processo de biorremediação *in situ* estão diretamente relacionadas com a presença e a diversidade da comunidade de microrganismos degradadores. Quanto maior for essa comunidade, mais acelerada e eficaz será a degradação dos poluentes, tornando o processo de recuperação ambiental mais eficiente (Chinellato, 2023).

Na aquacultura, as atividades de biorremediação geralmente são aplicadas após a geração dos efluentes, com o objetivo de tratá-los e remover nitrogénio, fósforo e sólidos em suspensão. Uma das estratégias possíveis é o uso de tanques de sedimentação ou alagados artificiais, construídos com macrófitas aquáticas. Vale a pena destacar que a mitilicultura (mexilhão) e a ostreicultura (ostra) são formas de aquacultura com menor impacto ambiental em comparação com a piscicultura (peixe) e a carcinicultura (camarão), podendo até trazer benefícios ao ecossistema. Os bivalves, devido à sua capacidade de filtração, desempenham um papel essencial na remoção de matéria orgânica em suspensão e contribuem para a reciclagem de nutrientes no ambiente aquático (de Abreu et al., 2023). De facto, diversas pesquisas demonstraram que animais que ingerem flúor, como o mexilhão herbívoro, podem contribuir para a melhoria da qualidade da água em lagoas de aquacultura. Isso ocorre porque, à medida que crescem, os mexilhões consomem fitoplâncton e partículas suspensas, influenciando os ciclos de nutrientes (Geng et al., 2022).

A perda de transparência da água ocorre devido à presença de diversas impurezas, incluindo matéria orgânica e inorgânica em suspensão, compostos orgânicos dissolvidos de coloração intensa, algas e outros microrganismos. A redução da transparência pode ser provocada tanto por processos naturais quanto por atividades humanas, que aumentam a quantidade de

sedimentos e substâncias dissolvidas no ambiente aquático (Golubkov e Golubkov, 2023). A avaliação da transparência da água é um método amplamente utilizado para analisar a qualidade dos ecossistemas aquáticos e integra os indicadores ambientais em sistemas de monitorização. A transparência da água é fundamental para a sobrevivência dos organismos aquáticos, pois a luz é indispensável para a produção primária pelo plâncton. Além disso, variações na transparência da água influenciam as interações tróficas nos ecossistemas aquáticos, afetando a dinâmica alimentar e a biodiversidade (Golubkov e Golubkov, 2023).

Apesar das limitações em relação ao que realmente avalia, o disco de Secchi continua a ser amplamente utilizado para fornecer uma estimativa rápida e simples da transparência da água. A sua popularidade deve-se à robustez e à facilidade de uso do equipamento. O disco de Secchi é empregado no método tradicional para determinar a transparência da água. A medição consiste em submergir o disco branco fosco (ou de cores preta e branca), com diâmetro de 20 ou 30 cm, até que ele deixe de ser visível ao observador. A profundidade em que isso ocorre é chamada de profundidade do disco de Secchi (Bowers et al., 2020). Este método, originalmente proposto por Secchi em 1864, é de fácil aplicação, económico e baseia-se no facto de que o espectro da luz visível se sobrepõe amplamente ao espectro da radiação fotossinteticamente ativa (PAR), que varia entre 400 e 700 nm (Golubkov e Golubkov, 2023).

A dificuldade na interpretação das medições do disco de Secchi ocorre porque a profundidade em que ele desaparece é influenciada por duas formas distintas de atenuação ótica. A luz solar que alcança o disco se propaga de maneira difusa, com os fotões seguindo uma trajetória em ziguezague. Essa trajetória é afetada pelo coeficiente de atenuação difusa (KD), que determina a taxa de redução da irradiância com a profundidade. Nesse processo, os fotões são absorvidos, enquanto a dispersão aumenta o percurso da luz, elevando a probabilidade de absorção. Por outro lado, a luz refletida pelo disco regressa ao olho do observador em linha reta, sendo a sua transmissão influenciada pelo coeficiente de atenuação do feixe (c), que afeta a radiância. Nesse caso, os fotões podem ser removidos tanto por absorção quanto por dispersão ao longo do trajeto (Bowers et al., 2020).

#### **7.1.1. Sólidos em suspensão e turbidez nos corpos hídricos**

Os sólidos suspensos são definidos como diferentes tipos de materiais sólidos presentes em corpos hídricos, os quais podem ser obtidos por meio da colheita de amostras de efluentes ou de água de outros corpos aquáticos. Para realizar a análise, utiliza-se um filtro de membrana de

fibra de vidro, no qual é filtrado um volume conhecido da amostra. O filtro é, então, seco em estufa a 100°C até que a água da amostra evapore, e o material sólido residual, retido no filtro é quantificado como sólidos em suspensão (Villardí, 2017).

A turbidez é a medida das propriedades de dispersão da luz em água que contém partículas suspensas ou coloides. Essas partículas podem ser compostas por diferentes substâncias ou outras partículas, variando desde algas microscópicas, como o fitoplâncton, até bactérias, partículas de argila suspensas e sólidos coloidais, os quais reduzem a transparência da água. A alta turbidez ocorre devido à grande quantidade de sólidos suspensos na água. Além dos sólidos inorgânicos, a turbidez também pode ser influenciada por outros materiais particulados, como matéria orgânica e células de algas (Villardí, 2017).

Como a turbidez mede apenas um dos efeitos dos sólidos suspensos (SS) e é influenciada por diversos fatores além da simples concentração de SS, as leituras de turbidez em turbidímetros com altos níveis de NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez) não indicam, necessariamente, uma alta concentração de sólidos suspensos (Villardí, 2017).

#### **7.1.2. Turbidez gerada por argila**

A argila é um composto que causa turbidez e, em ambientes aquáticos, pode formar partículas em suspensão. A sua composição inclui minerais como ilite e clorito e é formada por partículas de muito pequena dimensão, inferiores a 0,002 mm. A argila comum é utilizada no fabrico de diversos materiais, como tijolos, porcelanas, cerâmicas, blocos de concreto, tijolos refratários, superfícies de estradas e vidro. Os elementos presentes em pequenas quantidades nas argilas comuns podem ser tanto tóxicos, quanto micronutrientes, e sua concentração varia de acordo com a história geológica da região (Villardí, 2017).

A argila, quando presente como sólido suspenso, é responsável pela turbidez em rios e lagos. Os sólidos suspensos finos, com tamanhos na escala das nanopartículas, causam um impacto significativo no meio ambiente, devido à complexidade dos ciclos ecológicos e à dificuldade de realizar ensaios diretos em ambientes naturais. Além das nanopartículas formadas pelos sólidos em suspensão, o aumento do uso de nanomateriais em diversos produtos torna o meio aquático ainda mais vulnerável, especialmente devido à dispersão dessas nanopartículas por todo o sistema (Villardí, 2017).

O presente trabalho de projeto tem como objetivo principal avaliar a turbidez das águas de purga resultantes de uma unidade de aquacultura de corvina (*Argyrosomus regius*) em sistema de recirculação de aquícola (RAS), bem como investigar o potencial de biorremediação do mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) nesse tipo de efluente aquícola. Através da análise da capacidade filtradora dos mexilhões, pretende-se compreender em que medida esta espécie pode contribuir para a redução da carga de partículas em suspensão, promovendo a melhoria da qualidade da água descarregada. Este estudo visa, assim, explorar a viabilidade da utilização de organismos filtradores como estratégia complementar de mitigação ambiental em sistemas de produção aquícola.

## **7.2. METODOLOGIA**

A metodologia descrita neste protocolo experimental foi parcialmente baseada no trabalho de Abreu et al. (2023), com adaptações específicas para adequação à realidade deste estudo e ao contexto educacional em que será aplicado. O protocolo foi concebido para alunos do Ensino Secundário ou Superior, priorizando o uso de materiais de fácil acesso e baixo custo, o que facilita a sua execução em ambientes de ensino e aprendizagem.

Optou-se por métodos experimentais simples e didáticos, de forma a favorecer a participação ativa de todos os estudantes envolvidos, permitindo-lhes não apenas executar o protocolo, mas também refletir criticamente sobre cada etapa do processo, promovendo uma aprendizagem prática e contextualizada.

### **7.2.1. MATERIAIS NECESSÁRIOS**

Amostras de água da purga do sistema RAS;

Mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*);

Disco de Secchi;

Papel absorvente;

Recipientes de vidro ou plástico (ou aquários pequenos);

Bomba de ar e tubos de arejamento;

Termómetro;

Filtros;

Estufa de secagem (UF110, Memmert, Alemanha);

Balança analítica (NV3202, Ohaus, China).

### 7.2.2. PROCEDIMENTO

O presente estudo foi conduzido utilizando águas de purga provenientes de uma unidade de produção aquícola de corvina (*Argyrosomus regius*), localizada no porto de pesca em Peniche (SEAentia-Food, Lda.). As amostras de água foram recolhidas diretamente do sistema de purga em recipientes limpos e transportadas para o Laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, pertencente ao Instituto Politécnico de Leiria, no dia 10 de fevereiro de 2025, onde foram imediatamente utilizadas no ensaio.

Os mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) utilizados no ensaio foram colhidos na marina de Peniche, localizada no distrito de Leiria (09° 22'N, 39° 21'W), no dia 07 de fevereiro 2025. Os organismos foram posteriormente transportados para o Laboratório de Aquacultura da mesma instituição, onde foram submetidos a um processo de limpeza com água salgada filtrada, com o objetivo de remover impurezas e organismos aderentes às conchas. Em seguida, os mexilhões foram mantidos em recipientes contendo água salgada filtrada, sob arejamento constante, durante um período de 48 horas, para garantir a sua estabilização fisiológica.

Para este ensaio foram utilizados 48 mexilhões, mais ou menos do mesmo tamanho.

Foram selecionados quatro (4) grupos de 12 mexilhões, os quais foram secos cuidadosamente com papel absorvente e cada grupo foi pesado numa balança de precisão.

Foi registado o peso inicial em gramas.

Foram preparados seis (6) recipientes, com arejamento fornecido por uma bomba de aquário.

Os recipientes foram cheios com as amostras de água de purga (4 Litros/ recipiente), conforme a figura 7.1.

Em cada um dos quatro recipientes (1 e 2), foram adicionados 12 mexilhões previamente pesados.

Grupo 1: 1a – 1b – água salgada filtrada + 12 mexilhões

Grupo 2: 2a – 2b – água da purga da aquacultura + 12 mexilhões

Grupo 3: 3a – 3b – água da purga da aquacultura



Figura 7.1: Desenho experimental do ensaio de biorremediação ( $n=2$ ). Grupo 1 – controlo formado por água salgada filtrada + 12 mexilhões; grupo 2 – água residual (proveniente da purga da aquacultura) + 12 mexilhões; grupo 3 – controlo formado por apenas água residual.

Os recipientes foram mantidos em condições controladas de temperatura e oxigenação, para o que foi utilizada uma bomba de ar para garantir a oxigenação adequada (Figura 7.2).

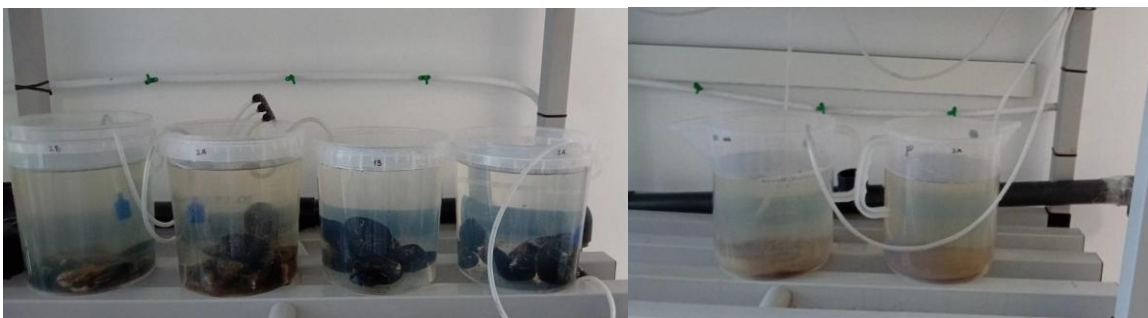


Figura 7.2.: Recipientes experimentais contendo água de purga com mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*), à esquerda, água salgada filtrada com mexilhões e, à direita, água de purga sem mexilhões, com arejamento.

Os mexilhões foram deixados em repouso durante 24h.

Para a avaliação da capacidade de biorremediação, foram medidos os parâmetros indicados abaixo.

### 7.2.2.1. MEDIÇÃO DA TURBIDEZ/TRANSPARÊNCIA

#### 7.2.2.1.1. Método do disco de Secchi

### a. Materiais Necessários

Foi utilizado o disco de Secchi, feito com um disco de plástico branco e preto dividido em quadrantes acoplado a uma régua, com centímetros e milímetros (figura 7.3).

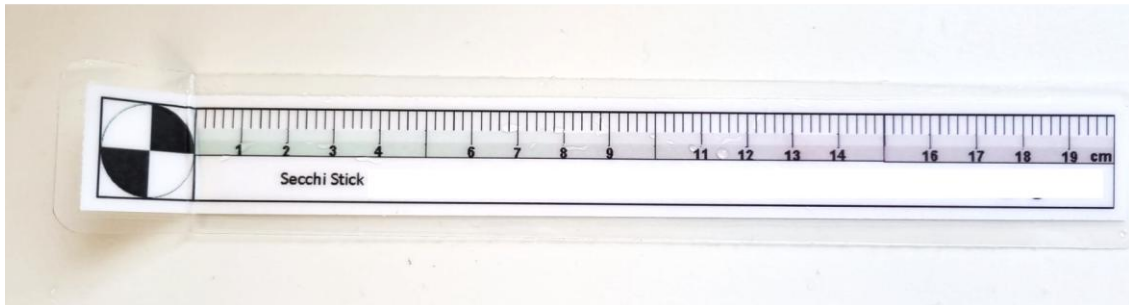


Figura 7.3: *Secchi stick* ou escala de Secchi, em centímetros, utilizada no ensaio.

### b. Procedimento

Garantimos que o disco está limpo. Agitou-se a água da purga para completa homogeneização.

Na vertical, submergiu-se o disco de Secchi na água de cada recipiente até ele desaparecer da vista. O disco foi baixado lentamente e sempre à mesma velocidade, sendo a medição repetida para cada recipiente.

Foi registada a distância a que o disco submergiu, em centímetros. Os resultados correspondem à média de 2 medições.

De acordo com Fetter & Koch (2022), os valores obtidos foram convertidos em Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU), conforme a tabela 7.1.

Quanto menor a profundidade, maior a turbidez da água.

Tabela 7.1.: Conversão da transparência, em centímetros, para unidades nefelométricas de turbidez (ntu) (Fetter & Koch, 2022).

cm	NTU	cm	NTU
6,4	>240	31,9 até 34,3	21
6,4 até 7,0	240	34,4 até 36,8	19
7,1 até 8,2	185	36,9 até 39,4	17
8,3 até 9,5	150	39,5 até 41,9	15
9,6 até 10,8	120	42,0 até 44,5	14
10,9 até 12,0	100	44,6 até 47,0	13
12,1 até 14,0	90	47,1 até 49,5	12
14,1 até 16,5	65	49,6 até 52,1	11
16,6 até 19,1	48	52,2 até 54,6	10
19,2 até 21,6	40	54,7 até 57	9
21,7 até 24,1	35	57 até 60	8
24,2 até 26,7	30	60 até 70	7
28,8 até 29,2	27	70 até 85	6
29,3 até 31,8	24	>85	<5

A redução da turbidez foi calculada, em percentagem, a partir da fórmula seguinte:

$$\text{Redução da Turbidez (\%)} = \left( \frac{\text{Turbidez Inicial} - \text{Turbidez Final}}{\text{Turbidez Inicial}} \right) \times 100$$

#### 7.2.2.1.2. Avaliação visual da turbidez, através do material particulado em suspensão

Na indisponibilidade de sulfato de hidrazina, substância padrão, carcinogénica, usada para medir a turbidez da água (Laboratório da Água, s.d.), foi utilizada argila, atendendo ao pequeníssimo tamanho das partículas em suspensão.

Foram preparadas soluções de argila com as concentrações sucessivamente menores (0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125%, 0,0156%, 0,0078%, 0%), em recipientes transparentes e idênticos (ex. Frascos Schott de 50 mL) (figura 7.4).



Figura 7.4.: Escala de turbidez, avaliada através concentrações conhecidas de argila, entre 0 e 0,5%.

Os frascos foram numerados de zero a oito.

A solução zero, com 0% de argila, é constituída por água destilada, sendo completamente transparente, enquanto as soluções com concentrações crescentes de argila são progressivamente mais turvas.

Antes de cada observação, as soluções foram bem homogeneizadas.

Foram colocadas as amostras numa área bem iluminada, a partir de uma fonte de luz branca uniforme. Foram evitados sombras e reflexos que pudessem interferir na avaliação.

Depois de homogeneizar o conteúdo do recipiente 1a, foram retiradas duas amostras de água de 10 mL.

Cada amostra foi colocada num gobelet de 50 mL, bem homogeneizada.

A primeira amostra foi comparada e registada o número do frasco que tem uma turbidez mais aproximada desta amostra de água.

Foi repetida o processo para a segunda amostra do mesmo recipiente 1a.

As medições foram repetidas para todas as amostras, duas por cada recipiente.

Os resultados foram registados às 0h, 24h, 48h e 72h em percentagem de material particulado em suspensão (% MPS).

## **7.2.2.2. METODO DA FILTRAÇÃO E PESO**

### **7.2.2.2.1. Materiais Necessários**

Filtros de café ou filtros de membrana (0,45 mm)

Proveta graduada

Gobelet de 250 mL

Estufa de secagem (ou forno)

Balança analítica

Erlenmeyer

Funil de filtração

Bomba de vácuo

#### 7.2.2.2.2. Procedimento

Foram colocados 4 filtros de membrana na estufa a 105°C durante 1h.

Os filtros secos foram retirados da estufa e pesados e o peso foi anotado.

Foi retirada uma amostra de 20 mL bem homogênea do recipiente 2a.

Foram filtrados a vácuo os 20 mL da amostra água (figura 7.5).



Figura 7.5: Dispositivo de filtração utilizado no ensaio, para medição do material particulado em suspensão.

Foram colocados os filtros na estufa, durante 24h a 105°C, até secar completamente.

Os filtros foram pesados e o peso foi registado de novo.

Foram repetidos todos os passos anteriores para os recipientes 2b, 3a e 3b.

Este procedimento foi efetuado às 0h e às 72h.

A concentração do material particulado em suspensão, foi calculado em gramas por litro, usando seguinte fórmula:

$$\text{MPS (g/L)} = \frac{(P2-P1)}{V} \times 1000$$

Onde:

P1 é o peso do filtro limpo e seco (g)

P2 é o peso do filtro com o material particulado seco (g)

V é o volume da amostra de água filtrada (L)

### **7.3. RESULTADOS**

Ao longo dos dias de ensaio, utilizando o disco de Secchi observou-se uma redução da turbidez na água residual contendo mexilhões. Na água residual sem mexilhões (Grupo 3), houve uma diminuição da turbidez nas primeiras 24 e 48 horas, seguida por um leve aumento ao final de 72 horas. A variação total de 6,8 cm $\pm$ 0,14 cm, no início do ensaio, para 10,55 $\pm$ 0,07 cm ao fim de 72h corresponde a, de acordo com a Tabela 7.1., uma redução da turbidez de 240,00 $\pm$ 0,00 NTU para 120,00 $\pm$ 0,00 NTU. Tal como no ensaio anterior, a maior variação de transparência da água registou-se no grupo 2, com água residual e mexilhões, a variar, ao fim de 72 horas de 7,75 $\pm$ 0,07 cm para 13,75 $\pm$ 1,06 cm (Figura 7.6). Isto corresponde a uma variação na turbidez de 185,00 $\pm$ 0,00 NTU para 77,50 $\pm$ 17,68 NTU. Por outro lado, na água salgada filtrada com mexilhões, não foram observadas variações significativas na turbidez ao longo do período experimental, uma vez que a turbidez foi sempre mínima (> 20 cm, correspondendo a < 5 NTU).

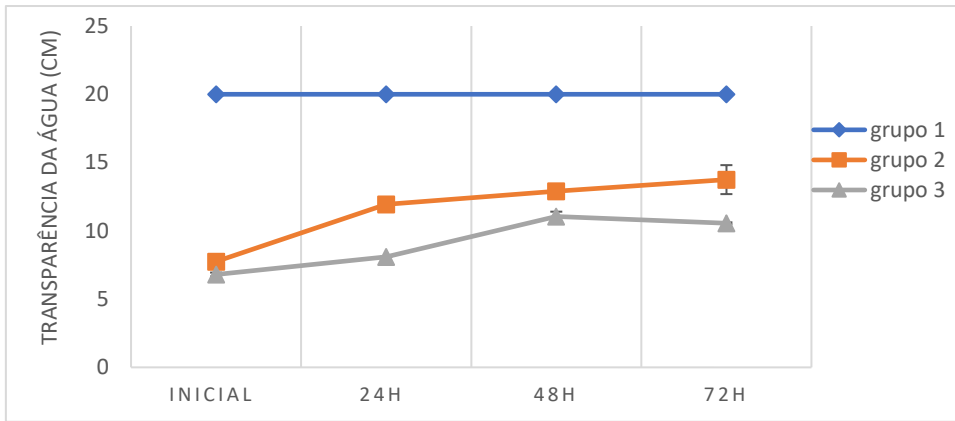


Figura 7.6: Percentagem média de redução da turbidez no controlo, constituído pela água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão (n=2).

Assim, a percentagem média de redução da turbidez (Figura 7.7) foi nula para o grupo 1, para o grupo 2 foi de  $58,11 \pm 9,56\%$  e para o grupo 3 foi de  $50,0 \pm 0,00\%$ .

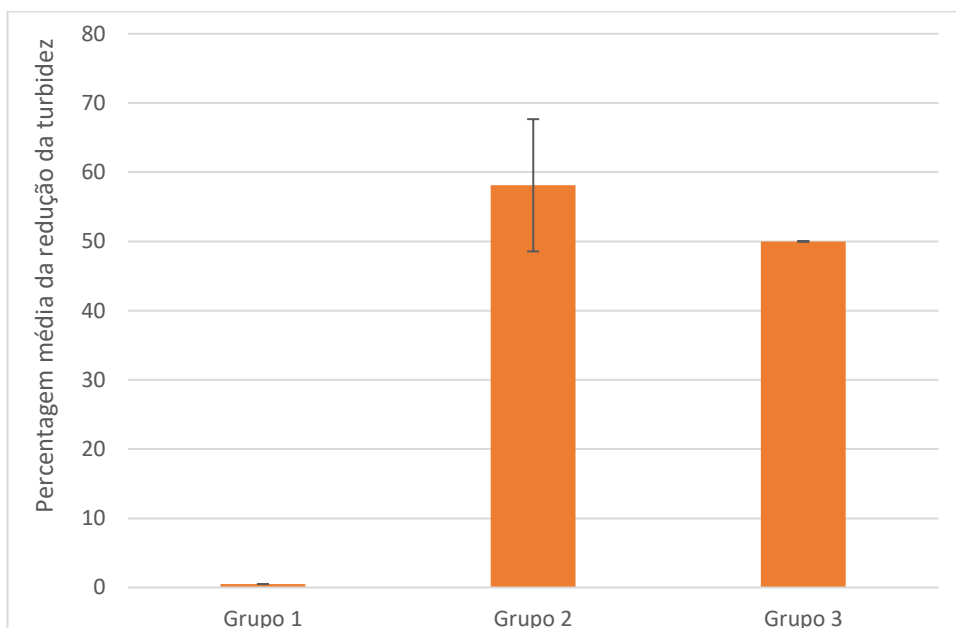


Figura 7.7: Percentagem média de redução da turbidez no controlo, constituído pela água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão.

A quantidade de sólidos suspensos nas águas em análise, com o teste comparativo da argila (figura 7.8) reduziu-se significativamente ao longo dos ensaios, o que resultou na diminuição da

turbidez da água. No controlo, não foi observada redução de sólidos suspensos, registando-se sempre valores de 0%. Nas águas residuais com mexilhões, verificou-se uma redução significativa de sólidos suspenso, de 0,125%, para 0,0078% de material particulado em suspensão (MPS), conseqüentemente, regista-se uma diminuição da turbidez. Por sua vez, nas águas residuais sem mexilhões, também se observou ao longo do período de ensaio um comportamento semelhante, embora com uma redução dos MPS um pouco inferior, de 0,125 % para 0,0156 % de MPS.

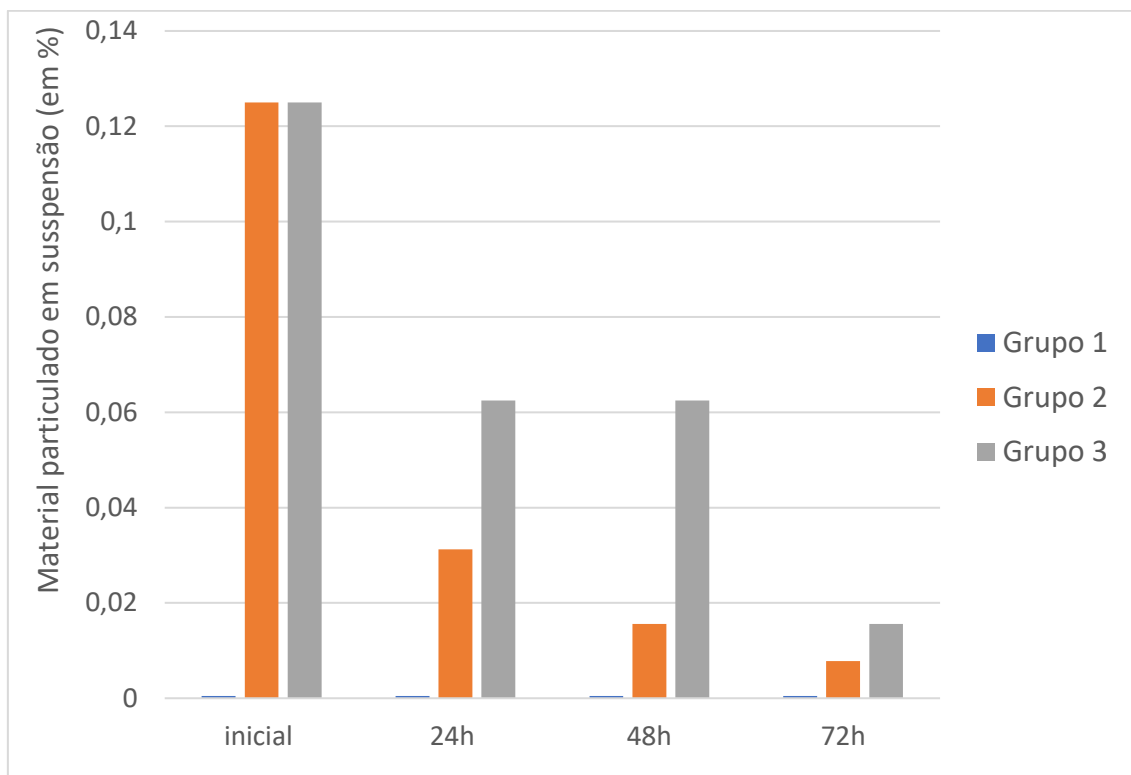


Figura 7.8: Material particulado em suspensão (mps) na água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão.

Na avaliação do peso do material particulado em suspensão, observa-se que o grupo 2 exibe uma concentração de MPS inicial de  $0,62 \pm 0,04$  g/L e final de  $0,33 \pm 0,04$  g/L, verificando-se, portanto, um decréscimo evidente dos sólidos em suspensão. A percentagem de redução dos MPS foi de 46,15%. Já o grupo 3 registou uma concentração MPS inicial de  $0,75 \pm 0,04$  g/L e final de  $0,41 \pm 0,04$  g/L, com uma percentagem de redução de peso média de 45,15% (Figura 7.9). Observam-se, portanto, uma diferença mínima entre os grupos 2 e 3. De notar que o grupo 1,

registrou um aumento percentual de peso na ordem dos 20% o que parece indicar um erro de leitura ou de procedimento.

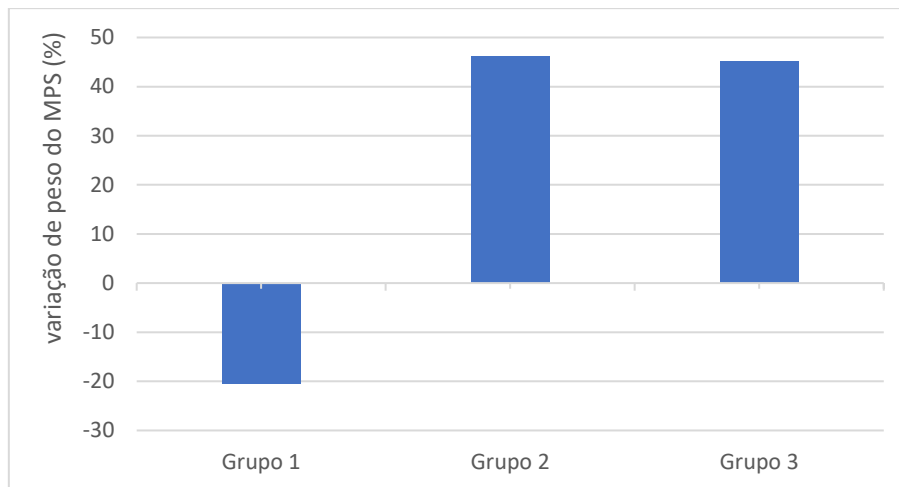


Figura 7.9: Variação da redução do peso da matéria particulada em suspensão (mps), na água salgada filtrada com mexilhões (grupo 1), a água da purga de aquacultura com mexilhões (grupo 2), e na água da purga de aquacultura sem mexilhões (grupo 3), ao longo do período experimental. Dados representados em percentagem média e desvio padrão.

Finalmente, ao analisar os resultados da variação de peso dos mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*), no início e no fim do ensaio (72h), observa-se uma maior percentagem de variação de peso na água residual, da purga da aquacultura, em comparação com o controlo. A análise do gráfico 7.10 evidencia de forma clara essa diferença em termos percentuais.

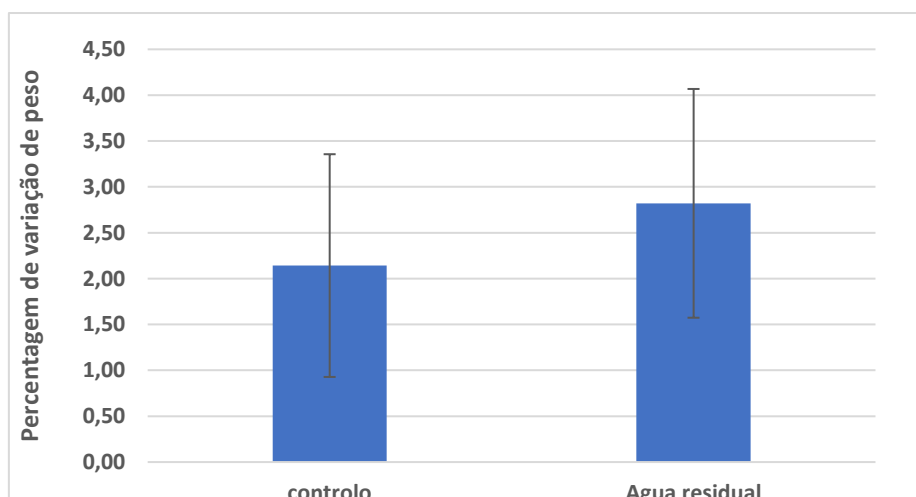


Figura 7.10: Percentagem de variação de peso dos mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) expostos à água residual e ao meio de controlo. No grupo de controlo, os mexilhões foram mantidos em água salgada

filtrada, enquanto no grupo de água residual, os mexilhões foram expostos à água da purga de aquicultura. Resultados expressos em percentagem média de variação de peso e desvio padrão.

No geral, os resultados demonstram que a presença de mexilhões resulta numa redução da turbidez da água de purga, demonstrando a sua capacidade de remover partículas em suspensão. Observam-se diferenças relevantes entre os recipientes com mexilhões e os recipientes sem mexilhões, confirmando o efeito de biorremediação ocorrido.

#### **7.4. DISCUSSÃO**

Os resultados deste trabalho reforçam a relevância da utilização de mexilhões como uma solução biotecnológica eficaz para a mitigação da poluição causada por efluentes de aquicultura, nomeadamente em sistemas de produção de corvina. Os mexilhões representam, atualmente, as principais espécies utilizadas em sistemas de aquicultura multitrófica integrada (IMTA) em ambientes marinhos, desempenhando um papel fundamental na captura e remoção de resíduos orgânicos particulados provenientes da criação de peixes (Cranford et al, 2013). Neste trabalho, a redução da turbidez observada nos ensaios laboratoriais representa uma evidência concreta do potencial destes organismos para atuar como agentes de biorremediação em águas de purga, um efluente não tratado, com elevada carga orgânica, e que, portanto, tem desafios próprios.

A função ecológica dos bivalves pode ser aproveitada para reduzir a carga de sólidos suspensos em sistemas de aquicultura, promovendo a reciclagem de nutrientes e diminuindo o impacto ambiental causado pela descarga de efluentes. De facto, outros trabalhos demonstram que os mexilhões têm a capacidade de reduzir os sólidos em suspensão, além da carga bacteriana, presentes tanto na água quanto nos sedimentos contaminados, contribuindo para a melhoria da qualidade ambiental, ao mesmo tempo em que apresentam desempenho alimentar equivalente (Bianchi et al, 2014). Além disso, parte dessas bactérias pode ser substituída, por meio do sistema digestivo dos bivalves, por microrganismos não patogénicos e amplamente distribuídos, que são naturalmente encontrados em ecossistemas de água doce (Sicuro et al, 2020). A capacidade dos mexilhões de remover partículas em suspensão resulta do seu comportamento alimentar, baseado na filtração contínua de grandes volumes de água. Esta atividade permite a retenção de partículas orgânicas e inorgânicas na sua glândula digestiva, contribuindo para a reduzir a turbidez e aumentar a transparência da água.

As medições realizadas com o disco de Secchi indicaram uma baixa variação na profundidade de Secchi ao longo dos ensaios. Esse comportamento pode estar associado a imprecisões na determinação exata da profundidade de visibilidade associadas ao facto de este ser um ensaio meramente visual suscetível a erros por parte do operador. No entanto, os resultados obtidos neste estudo permitem confirmar a redução da turbidez da água residual após o tratamento com mexilhões. Segundo Bowers et al. (2020), é necessário reconhecer que a determinação precisa de pequenas profundidades de Secchi apresenta considerável dificuldade, especialmente em condições de perturbação na superfície da água. As observações registadas demonstram significativa dispersão, o que pode ser atribuído, em parte, a limitações na precisão das medições realizadas. Além disso, essa dispersão pode ser explicada por variações nas propriedades óticas das partículas em suspensão, que tendem a apresentar diferenças espaciais e temporais. Poderão ter ocorrido também misturas pouco homogêneas das amostras analisadas.

O mecanismo de alimentação dos mexilhões pode favorecer o aumento da transparência da água e a maior penetração da luz na coluna de água. No estudo de Geng e colaboradores, sobre a capacidade de biorremediação do mexilhão em efluentes com alta carga de nutrientes provenientes de esgoto, verificou-se que a transparência da água no rio Kulv apresentou um aumento de 1,0 para 1,4 metros, resultado da eficiente regulação da concentração de fitoplâncton e da conseqüente redução dos níveis de clorofila  $a$ , proporcionada pelo processo de filtração realizado pelos mexilhões. Foi constatado, ainda, que as populações de mexilhões contribuíram para a melhoria da qualidade da água numa lagoa costeira urbana submetida a diversos impactos ambientais (Geng et al., 2022).

A aplicação de mexilhões como biofiltros pode, portanto, funcionar como uma estratégia complementar à implementação de boas práticas de gestão de efluentes, contribuindo para a conformidade ambiental da atividade. Este tipo de abordagem biotecnológica pode revelar-se particularmente relevante em regiões onde a pressão ambiental sobre massas de água recetoras é elevada ou onde existem regulamentações ambientais cada vez mais restritivas.

Dos ensaios realizados, a variação de peso dos mexilhões, a percentagem da redução da turbidez medida com o disco de Secchi e a percentagem de material particulado em suspensão (MPS) em comparação com a argila demonstraram ser métodos eficientes para a avaliação da capacidade

de biorremediação. Quanto ao peso da MPS, sendo um método comumente utilizado, os resultados foram menos interessantes, provavelmente associados a erros no procedimento.

O uso deste protocolo no ensino integra teoria e prática, incentivando a aplicação do conhecimento em problemas ambientais reais. Em laboratórios acadêmicos, demonstra a função dos mexilhões na biorremediação, melhorando a qualidade da água e desenvolvendo habilidades científicas. No ensino secundário, facilita o aprendizado de ecologia aquática e poluição, promovendo pensamento crítico e trabalho colaborativo. No ensino superior, permite a investigação da biorremediação em diferentes condições, com análise de dados e aplicação de métodos estatísticos. Conceitos abordados incluem turbidez da água, ecologia aquática e aquacultura sustentável.

## **7.5. APLICAÇÕES PRÁTICAS E PERSPETIVAS FUTURAS**

Os resultados deste estudo indicam que o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* apresenta potencial significativo como biofiltro em sistemas de aquacultura, contribuindo para a redução da turbidez e da carga de sólidos suspensos em águas residuais. Essa capacidade de filtração pode ser aplicada em unidades aquícolas, especialmente aquelas operadas em sistemas de recirculação (RAS), como uma estratégia complementar de biorremediação.

Além do seu uso direto na melhoria da qualidade da água, essa abordagem pode favorecer a sustentabilidade da produção aquícola, reduzindo o impacto ambiental e promovendo a reutilização da água em ciclos produtivos. Essa estratégia também pode integrar programas de monitorização ambiental em áreas costeiras com alta densidade de instalações aquícolas, oferecendo uma solução baseada na natureza (*nature-based solution*) para a gestão de efluentes.

Futuros trabalhos de investigação podem aprofundar a avaliação da eficiência do mexilhão em diferentes condições ambientais, incluindo variações de temperatura, salinidade e carga orgânica, utilizar outras técnicas de análise, além de investigar o potencial de uso de consórcios de diferentes organismos filtradores para maximizar os resultados. Por fim, a aplicação desse sistema em escala comercial pode contribuir para fortalecer a imagem da aquacultura como uma atividade ambientalmente responsável e alinhada com princípios de economia circular.

#### QUESTÕES PARA DEBATE EM SALA DE AULA

1. Qual foi a principal variável ambiental analisada nesta experiência?
2. Qual dos grupos apresentou maior redução na turbidez da água ao final das 72h?
3. Qual foi a diferença mais marcante entre os grupos 2 e 3, considerando a presença ou ausência de mexilhões?
4. Explique por que a turbidez não sofreu alterações no grupo 1, mesmo com a presença de mexilhões.
5. Como a variação de peso dos mexilhões pode estar relacionada com o tipo de água em que foram mantidos?
6. De que forma os resultados desta experiência evidenciam a capacidade de biorremediação dos mexilhões?

## 8 - CONCLUSÃO

---

Os protocolos laboratoriais desenvolvidos são, de facto, uma resposta prática e sensível às necessidades locais. A escolha por materiais de fácil acesso e por temas diretamente ligados à biodiversidade marinha e ao quotidiano das comunidades costeiras demonstra uma compreensão profunda da realidade educacional desses países. Essa abordagem favorece não apenas a aprendizagem significativa, mas também a construção de uma consciência crítica e ambientalmente responsável entre os estudantes. Além disso, ao articular conteúdos científicos com práticas experimentais contextualizadas, o trabalho reafirma a importância de uma educação que dialogue com o território, com as culturas locais e com os desafios socioambientais contemporâneos.

No entanto, apesar dos resultados obtidos, alguns aspetos ainda podem ser aprimorados. Em primeiro lugar, seria interessante que o trabalho aprofundasse a discussão sobre estratégias de formação continuada para professores, visto que a implementação eficaz desses protocolos exige não apenas materiais e estrutura, mas também capacitação docente. Ademais, a criação de redes colaborativas entre escolas, universidades e centros de investigação poderia potencializar o impacto do presente trabalho, estimulando trocas de experiências, atualização constante dos materiais e até mesmo a produção de novos conteúdos adaptados a diferentes regiões.

Outro ponto que merece atenção é a avaliação do impacto pedagógico das atividades. Embora os protocolos sejam descritos com clareza e com base em bibliografia, faltam dados ou instrumentos sistemáticos que permitam mensurar, de forma objetiva, os resultados no desempenho dos alunos, no desenvolvimento de competências ou na mudança de atitudes frente às questões ambientais. Incorporar mecanismos de monitorização e avaliação contínua fortaleceria ainda mais a legitimidade e a eficácia da proposta.

Por fim, destaca-se a necessidade de pensar em estratégias de sustentabilidade a longo prazo. A replicação e adaptação dos protocolos a diferentes realidades dos PALOP dependerão do envolvimento de políticas públicas, da mobilização de recursos locais e do compromisso coletivo com uma educação científica mais equitativa.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

*Animais da Ria Formosa*. (n.d.). Moluscos gastrópodes, amêijoas e berbigões. *Animais da Ria Formosa*. <https://animaisdariaformosa.blogspot.com/p/moluscos-gastopodes-ameijoas-berbigoes.html> acessido a 22 fevereiro 2025.

Arruda, M. R. E., da Silva Barbosa, E. K., da Silva, C. F., & Vinhas, G. M. (2019). Avaliação de extratos de antocianinas como indicadores de pH obtidos por diferentes métodos. *Brazilian Journal of Food Research*, 10(3), 87-100.

Azevedo, M., Mafra, P. & Carvalho, G.S. (2022). Formação de professores sobre fermentação/respiração de leveduras com material acessível para a 12.<sup>a</sup> classe de Moçambique. In: C. Teixeira, V. Gonçalves, P.O. Fernandes, Araújo, C.S. & Rodrigues, A.S. (Eds.) Livro de Atas LUSOCONF2021 – III Encontro Internacional de Língua Portuguesa e Relações Lusófonas (pp. 12–22). Instituto Politécnico de Bragança.

Bamigboye, G., Enabulele, D., Odetoyan, A. O., Kareem, M. A., Nworgu, A., & Bassey, D. (2021). Mechanical and durability assessment of concrete containing seashells: A review. *Cogent Engineering*, 8(1), 1883830.

Bianchi, V. A., Castro, J. M., Rocchetta, I., Bieczynski, F., & Luquet, C. M. (2014). Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (*Diplodon chilensis*) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian Lake. *Fish & shellfish immunology*, 37(2), 268-277.

Bordignon Jr, C. L., Francescato, V., Nienow, A. A., Calvete, E., & Reginatto, F. H. (2009). Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Food Science and Technology*, 29, 183-188.

Bowers, D. G., Roberts, E. M., Hoguane, A. M., Fall, K. A., Massey, G. M., & Friedrichs, C. T. (2020). Secchi disk measurements in turbid water. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 125(5), e2020JC016172.

Capello, C. (2020). *Desenvolvimento de biohíbrido à base de antocianina da casca de beringela (Solanum melongena L.) e Laponita®: estudo da cinética de adsorção/dessorção, caracterização morfológica e físico-química*, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/216347>

Carral, L., Lamas-Galdo, M. I., Buenhombre, J. L. M., Barros, J. J. C., Naya, S., & Tarrío-Saavedra, J. (2023). Application of residuals from purification of bivalve molluscs in Galician to facilitate marine ecosystem resiliency through artificial reefs with shells—One generation. *Science of The Total Environment*, 856, 159095.

Cavalcante, M. M. D. S. (2018). *Extração de polifenóis, mangiferina e pectina da casca de manga (Mangifera indica L.) cv. Tommy Atkins utilizando sistema pressurizado*, Dissertação de

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1105093/1/DOT18017.pdf>

Cerqueira, U. M. F. M., Menezes, R. M., Nunes, L. S., Lemos, V. A., Novaes, C. G., & Bezerra, M. A. (2025). Nutritional evaluation after copper cloud point extraction in spirulina (*Arthrospira* sp.) samples with determination by digital image colorimetry. *Food Chemistry*, 470, 142592.

Kutluyer Kocabaş, F., Kocabaş, M., Çanakçı, A., & Karabacak, A. H. (2023). Mechanical property and structural-elemental analysis of marine bivalve mollusc shells: *Cerastoderma edule*, *Chamelea gallina*, *Donax trunculus*, *Ruditapes decussatus*. *International Aquatic Research*, 15(1), 39-50.

Chinellato, R. A. M. (2023). *Avaliação do potencial de biorremediação de diesel S10 e de espuma para controle de incêndio (AFFF) por bactérias heterotróficas isoladas de sedimentos do Estuário de Santos-SP*, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Paulo.

Choi, I., Lee, J. Y., Lacroix, M., & Han, J. (2017). Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Food chemistry*, 218, 122-128.

Cindana Mo'ó, F. R., Wilar, G., Devkota, H. P., & Wathoni, N. (2020). Ulvan, a polysaccharide from macroalga *Ulva* sp.: A review of chemistry, biological activities and potential for food and biomedical applications. *Applied Sciences*, 10(16), 5488.

Cordeiro, N. K., da Silva, E. C., da Silva, L. S., Masiero, M. A., de Oliveira, V. H. D., Menechini, W., Almeida, J., Pinheiro, J. F. 2022, Situação do melhoramento genético na cultura da bananeira Capítulo 3. In Pesquisas agrárias e ambientais, Volume XII, Pantanal Editora, Brasil. <https://www.editorapantanal.com.br/ebooks/2022/pesquisas-agrarias-e-ambientais-volume-xii/ebook.pdf#page=31>

Costa, R. C. C. (2016). *Pigmentos azul (ficocianina) e vermelho (r-ficoeritrina) da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): purificação e caracterização parcial*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/21489>

Cranford, P. J., Reid, G. K., & Robinson, S. M. (2013). Open water integrated multi-trophic aquaculture: constraints on the effectiveness of mussels as an organic extractive component. *Aquaculture Environment Interactions*, 4(2), 163-173.

Delgado, F. J. S., Vaz, C. A. G., Lima, H. S., Correia, K. E. G., Borges, M. A. S. A., Ughalah, O. Q., & Lopes, B. D. S. (2023). Montagem de microscópios a partir de resíduos: um exemplo de Cabo Verde. *APeDuC Revista-Investigação e Práticas em Educação em Ciências, Matemática e Tecnologia*, 4(1), 138-152.

de Almeida, C. S., Feitosa, E. M. S., dos Santos Silva, C. A., da Silva Santos, I. M., Guedes, É. A. C., Colin, F. N. & da Silva, B. L. R. (2007). Obtenção e caracterização de extratos de algas para uso na indústria de cosméticos. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, 19(5/8), 154-159.

de Abreu, W. F., da Silva, K. C. L., Barbas, L. A. L., & da Rocha, C. A. M. (2023). Estudo prospectivo sobre a aplicação da biorremediação na aquicultura. *Cadernos de Prospecção*, 16(1), 262-277.

de Lima, V. Z., de Ávila Dias, D. T., Tartarotti, L., & Rocha, É. A. G. (2022). Logística reversa de conchas de ostras marinhas. *Revista Livre de Sustentabilidade e Empreendedorismo*, 7(6), 178-197.

de Nazaré, P. M., Aguilera, M. P., Patrocínio, O., Papagaio, M. (2024) A identidade profissional dos professores de química do ensino secundário do Cuanza Sul–Angola. Comunicação apresentada no III Encontro de Jovens Investigadores da CPLP sobre África, Luanda, Angola. Disponível em [https://www.encontrojovensinvestigadorescplp.org/uploads/1/3/5/2/135236659/comunicac%C3%A7%C3%A3o\\_pascalina\\_de\\_nazare%CC%81\\_et\\_all\\_cplp\\_2024.pdf](https://www.encontrojovensinvestigadorescplp.org/uploads/1/3/5/2/135236659/comunicac%C3%A7%C3%A3o_pascalina_de_nazare%CC%81_et_all_cplp_2024.pdf), acessado a 30 abril 2025.

Dias, T. H. D. C., & Marques, R. C. (2014). Ciência em sala de aula: extraindo ADN. Anais do II seminário estadual PIBID do Paraná, Foz do Iguaçu, 22 a 24 outubro 2014, disponível em <https://dspace.unila.edu.br/server/api/core/bitstreams/2ab478ce-9178-4bc7-99da-28ce1aa9ab2e/content>, acessado a 30 abril 2025.

Dominguini, L., Borges, J. M., dos Santos, M. D., Leandro, F. P., de Sousa Toledo, A. L., & Figueiredo, A. P. (2014). Estudo da estabilidade de antocianinas em diferentes álcoois alifáticos para uso como indicador de pH. *RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais*, 16(1).

dos Santos Almeida, C., de Lima Yamaguchi, K. K., & de Oliveira Souza, A. (2020). O uso de indicadores ácido-base naturais no ensino de Química: uma revisão. *Research, Society and Development*, 9(9), e175997243-e175997243.

dos Santos Paraíso, C. M. (2011). *Contributos para o ensino experimental da Química em países de língua oficial portuguesa: Cabo Verde*. Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

FAO. (2019, maio 9). FAO prevê fortes perspectivas de crescimento para produção global e comércio de frutas tropicais. <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1193684/>

Ferreira, M. D. L. S. V. (2011). *Novas Atividades Experimentais Para o Ensino básico-secundário*, Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho.

Fetter, J.R., Koch, K. (2022). Understanding Transparency Tube Measurements, PennState Extension, disponível em <https://extension.psu.edu/understanding-transparency-tube-measurements>, acessado a 12 de fevereiro 2025.

Freitas, V. (2019). O mundo colorido das antocianinas *Rev. Ciência Elem.*, V7(02):017 <https://doi.org/10.24927/rce2019.017>

Galvão, T. B., Ferreira, D. A. N. M., de Carvalho, L. E. F., Rezende, N. C. C., & Voigt, E. L. (2012). Protocolo acessível para aula prática sobre fatores físicos e químicos que afetam a integridade das biomembranas. *Revista de Ensino de Bioquímica*, 10(1), 1-9.

Gaspar, M. J. B. (1996). *Bivalves Do Litoral oceânico Algarvio. Aspectos Da Biologia, Ecologia e Da Pescaria Dos Mananciais De Interesse económico: aplicação à Gestão Dos Recursos*. Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve. <http://hdl.handle.net/10400.1/7501>

Geng, B., Li, Y., Liu, X., Ye, J., & Guo, W. (2022). Effective treatment of aquaculture wastewater with mussel/microalgae/bacteria complex ecosystem: a pilot study. *Scientific reports*, 12(1), 2263.

*Geologyscience*. (2024, outubro 29). Geologia: dureza mineral e a escala de Mohs. <https://pt.geologyscience.com/geologia/dureza-mineral-e-escala-de-mohs/>

Gololobova, M.A., Belyakova, G.A. Position of Algae on the Tree of Life. *Doklady Biological Sciences*, 507(1), 312–326. <https://doi.org/10.1134/S0012496622060035>

Golubkov, M. S., & Golubkov, S. M. (2023). Secchi disk depth or turbidity, which is better for assessing environmental quality in eutrophic waters? A case study in a shallow hypereutrophic reservoir. *Water*, 16(1), 18.

Gonçalves, T. M. (2021). Permeabilidade da membrana plasmática celular da beterraba: uma proposta de aula prática no ensino médio. *Research, Society and Development*, 10(3), e30010313479-e30010313479.

Gorgich, M., Passos, M. L., Mata, T. M., Martins, A. A., Saraiva, M. L. M., & Caetano, N. S. (2020). Enhancing extraction and purification of phycocyanin from *Arthrospira* sp. with lower energy consumption. *Energy Reports*, 6, 312-318.

Kotz, F. A., Artmann, M., & Aarestrup, J. R. (2014). O uso de etanol e isopropanol na extração de ADN de plantas. *BIOFARM-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 10(1), 55-61.

Kutluyer Kocabaş, F., Kocabaş, M., Çanakçı, A., & Karabacak, A. H. (2023). Mechanical property and structural-elemental analysis of marine bivalve mollusc shells: *Cerastoderma edule*,

Laboratório da água, (s.d.), Parâmetro Físico de Qualidade: Turbidez da Água, disponível em <https://www.digitalwater.com.br/turbidez-da-agua/>, acessado a 12 de fevereiro de 2025.

Lopes, T., Xavier, M., Quadri, M. G., & Quadri, M. (2007). Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Current Agricultural Science and Technology*, 13(3).

Mangaravite, E., Agostinho, L., Mariotini-Moura, C., Silveira, F. A., & Ferreira, M. A. de M. (2020). Apostila de aulas práticas: Biologia Geral – Citologia, Genética e Biologia Molecular (Vol. II). UNIFAMINAS. ISBN 978-65-88341-00-1.

Manchinemfg. (2024), dezembro 2). Tabela de dureza de metais. [https://www.machinemfg.com/pt\\_br/metal-hardness/](https://www.machinemfg.com/pt_br/metal-hardness/), acessado a 12 de fevereiro de 2025.

Martins, M., Oliveira, R., Coutinho, J. A., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P., Pinto, D. C., & Ventura, S. P. (2021). Recovery of pigments from *Ulva rigida*. *Separation and Purification Technology*, 255, 117723.

Matsuura, F. C. A. U., Costa, J. I. P. D., & Folegatti, M. I. D. S. (2004). Marketing de banana: preferências do consumidor quanto aos atributos de qualidade dos frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26, 48-52.

McCauley, J. I., Winberg, P. C., Meyer, B. J., & Skropeta, D. (2018). Effects of nutrients and processing on the nutritionally important metabolites of *Ulva* sp. (Chlorophyta). *Algal research*, 35, 586-594.

Monteiro, R. B. V. (2022). *Desenvolvimento de argamassa ecoeficiente à base de conchas de ostras* Dissertação Mestrado, Universidade do Minho. <https://hdl.handle.net/1822/81509>

Mouga, T. (2024). Integridade membranar: a resposta da membrana plasmática ao stress térmico e aos solventes orgânicos em células de beterraba. *Captar, Ciência e ambiente para todos*, 13(2), 1-13

Nithiyaa, N., Ho, A. X., Norhanis, M. R., Zulfigar, Y., & SH, A. T. (2021). The effect of acidified seawater on shell characteristics of blood cockle, *Tegillarca granosa*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 7(3), 133-142.

Oenning, V., & De Oliveira, J. M. P. (2011). Dinâmicas em sala de aula: envolvendo os alunos no processo de ensino, exemplo com os mecanismos de transporte da membrana plasmática. *Revista de Ensino de Bioquímica*, 9(1), 18-29.

Perrier X., Jenny C., Bakry F., Karamura D., Kitavi M., Dubois C., Hervouet C., Philippson G., Langhe E. (2019) East African diploid and triploid bananas: a genetic complex transported from South-East Asia, *Annals of Botany*, 123(1): 19–36, <https://doi.org/10.1093/aob/mcy156>

Quadé-Lisboa, D. M., Guerra-Lisboa, J., CE, E. S. M. R., & da Silva Costa-Redenção, E. A. (2024). Formação de professores de ciências da natureza em Guiné-Bissau: desafios e perspectivas. *Revista Educação & Ensino*, 8(1).

Ribeiro, N. M., & Nunes, C. R. (2008). Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. *Química nova na escola*, 29(8), 34-37.

Sandeep, K. P., Shukla, S. P., Vennila, A., Purushothaman, C. S., & Manjulekshmi, N. (2015). Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in low-cost seawater based medium for extraction of value-added pigments. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44, 3.

Sicuro, B., Castelar, B., Mugetti, D., Pastorino, P., Chiarandon, A., Menconi, V., & Prearo, M. (2020). Bioremediation with freshwater bivalves: A sustainable approach to reducing the

environmental impact of inland trout farms. *Journal of Environmental Management*, 276, 111327.

Silva, A. C. D. (2022). *Metodologias ativas em espaços educativos: processos de alfabetização científica em laboratórios móveis do projeto academia STEM*, Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas.

Silva, G. C. (2012). *Bioatividade de extratos de algas frente às bactérias com fatores de virulência, resistentes a antimicrobianos* Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Ceará. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/11494>

Silva, A. R. D., Meira, R. R., Oliveira, J. M. D., Silva, A. R. D., Ribeiro, N. R., & Silva, L. M. D. (2013,). *Extração de pigmentos fotossintéticos em folhas das espécies de café (Coffea arabica), acálifa (Acalypha hispida) e urucum (Bixa orellana) por meio de cromatografia em papel*. organizados pela Embrapa Café. 8º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Salvador, Bahia. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/3494>

Silva, D., Debacher, N. A., Castilhos Junior, A. B. D., & Rohers, F. (2010). Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da ilha de Santa Catarina. *Química Nova*, 33, 1053-1058.

Simon D., Helliwell S. (1998) Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae, *Water Research*, 32(7): 2220-2223, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00452-1)

Sousa, M. B. D. (2005). *Extração e quantificação de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em macroalgas marinhas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/18485>

Tosta, E. M., Gontijo, A. B. P. L., & Corte, V. B. (2020). Extração e observação de molécula de ADN-Ferramenta para auxiliar no ensino de Biologia: ADN molecule extraction and observation-Tool to assist in Biology teaching. *Health and Biosciences*, 1(3), 68-77.

Vaile, F. K. U., Lopes, B., & Loureiro, M. J. (2021). Inovar na Educação em Ciências em Angola: Um estudo exploratório na formação contínua de professores na área da Bioenergética. *Da Investigação às Práticas: Estudos de Natureza Educacional*, 11(1), 102-122. <https://ojs.eselx.ipl.pt/index.php/invep/article/view/229>

Valenti, W. C. (2002). Aquicultura sustentável. In *12º Congresso de Zootecnia* (pp. 111–118). Vila Real, Portugal: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos.

Vidotti, E. C., & Rollemberg, M. D. C. E. (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química nova*, 27, 139-145.

Villard, B. D. Q. (2017). *Avaliação dos efeitos da turbidez nos ensaios ecotoxicológicos com Daphnia similis*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Yun, Y. J., Lee, S., Kim, Y., & Ryu, Y. B. (2023). Effect of Various Acid Solutions on the CO<sub>2</sub> Dissolution Rate, Morphology, and Particle Size of Precipitated Calcium Carbonate Synthesized Using Seashells. *Materials*, *16*(24), 7665.

Waldbusser, G. G., Steenson, R. A., & Green, M. A. (2011). Oyster shell dissolution rates in estuarine waters: effects of pH and shell legacy. *Journal of Shellfish Research*, *30*(3), 659-669.