

Diseño y aplicación de una práctica de fotosíntesis para estudiantes de biología celular del IPC-UPEL

Design and implementation of a photosynthesis laboratory to students of cellular biology of the IPC-UPEL

Marlene Toledo

marlene8atoledo@gmail.com

Rosa Elena Camero

cameronegrilla1@gmail.com

Jaudy Durán

jaudy.duran.upel@gmail.com

Deysi Villamizar

deysi.villamizar@gmail.com

Leglys Contreras

leglyscv@gmail.com

Universidad Pedagógica Experimental Libertador.

Instituto Pedagógico de Caracas

RESUMEN

La fotosíntesis comprende dos grupos de reacciones; un grupo tiene que ver con reacciones dependientes de la luz. El objetivo fue diseñar un experimento que permita la cuantificación del proceso. La metodología es una adaptación de Hall, D. y Hawkins, S. (1975) y Hall y Rao (1972), que se fundamenta en la reacción de Hill y que utiliza como agente reductor el 2,6 dinitrofenolindofenol. El laboratorio incluye: 1) Aislamiento de cloroplastos, 2) Observación de cloroplastos y 3) Efecto de algunas variables en la actividad fotosintética. La actividad ha sido aplicada durante varios semestres a estudiantes de Biología Celular, asignatura del programa de Biología del Instituto Pedagógico de Caracas (UPEL). Una vez analizados los resultados se pudo observar que los estudiantes consideran dicha actividad necesaria para complementar la clase de teoría y que, la motivación producida, estimula el aprendizaje cooperativo e individual; todo ello indica la conveniencia de continuar aplicando dicha actividad

Palabras clave: Fotosíntesis; cloroplastos; colorante 2,6 dinitrofenolindofenol

ABSTRACT

Photosynthesis involves two groups of reactions: one group includes the light-dependent reactions. The main objective of this activity is to design an experiment to allow quantification of the process. The methodology is adapted from Hall, D. and Hawkins, S. (1975) and Hall and Rao (1972), which is based on Hill's reaction which uses 2,6 dinitrophenolindophenol as a reducing agent. The laboratory includes: 1) Isolation of chloroplasts, 2) Observation of chloroplasts and 3) Effect of some variables in the photosynthetic activity. The activity has been applied for several semesters to students of Cell Biology, a course that corresponds to the Biology program at the Pedagogical Institute of Caracas (UPEL). Having analyzed the results of implementation, it was observed that students consider this activity necessary to complement the theory and that the motivation produced encourages them to cooperative and individual learning; all point to the desirability of continuing to apply this activity.

Key words: Photosynthesis; chloroplasts; 2,6 dinitrophenolindophenol

INTRODUCCIÓN

La asignatura de Biología Celular presenta una serie de tópicos que resultan complejos para su comprensión. Aunque algunos de ellos se han visto en otros cursos, los estudiantes no llegan a entender procesos como transporte electrónico, fotosíntesis y respiración, entre otros. En la Cátedra de Biología Celular del Instituto Pedagógico de Caracas, los estudiantes tienen como pre-requisito haber cursado bioquímica lo que permite profundizar esos procesos para poder integrar la estructura y la función dentro del contexto de la célula. Sin embargo, la poca comprensión por parte de los estudiantes, que dificulta el aprendizaje significativo, ha conducido a que en la Cátedra se utilicen diversas estrategias, tales como procesadores de información, simulaciones - juegos instruccionales, seminarios, pruebas de reflexión para la casa y prácticas de laboratorio. De estas últimas se han implementado tanto prácticas estructuradas como semi-estructuradas para permitir el desarrollo de habilidades y competencias en el laboratorio.

La práctica de laboratorio es ese espacio de aprendizaje donde el estudiante desarrolla y adquiere destrezas que le permiten comprobar, y en muchos casos entender, los conceptos teóricos que debe aprender respecto a las diferentes asignaturas, y sobre todo, establecer relaciones con otros conocimientos previos que ya debe poseer. Por su orientación práctica y aplicativa debe entonces correlacionarse directamente con el “saber hacer” propio de modelos constructivistas y partir de la visión del aprendizaje significativo de Ausubel que implica la comprensión, la organización de los nuevos conocimientos y los que posee el alumno (proceso de acomodación), y finalmente, establecer una jerarquización de ellos que permita interrelacionarlos para producir el esperado efecto de asimilación. Por todo esto, se plantea la actividad de laboratorio como *estrategia de aprendizaje significativo* en la que el alumno “aprende a pensar” resolviendo problemas reales. Ésta rompe con el paradigma de la educación clásica centrada en el maestro y en métodos tradicionales de aprendizaje memorístico, y concientiza al alumno de su necesidad de aprender y de llegar más allá de las notas de clase, para que con la adecuada motivación y la colaboración del docente, pueda lograr ser autónomo de su propio aprendizaje (Ferney, 2004).

La práctica de laboratorio tiene como objetivo fomentar una enseñanza más activa, participativa e individualizada, donde se impulse el método científico y el espíritu crítico. De este modo se favorece que el alumno desarrolle habilidades, aprenda técnicas elementales y se familiarice con el manejo de instrumentos y aparatos (Prácticas de laboratorio, 2009).

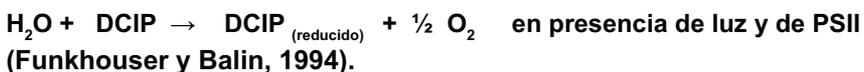
El presente trabajo representa el diseño de una práctica semi-estructurada en un tópico de alta complejidad como es la fotosíntesis. En las prácticas semi-estructuradas hay una metodología común para todos los grupos, pero cada uno es responsable de trabajar su experimento con un problema diferente a resolver. Por eso, una actividad de laboratorio semi-estructurado, no es un ejercicio nada más. Va más allá de las habilidades prácticas. Aquí se manejan estrategias de investigación en cuanto al diseño del experimento, formulación de hipótesis, control de variables, tratamiento de los datos, interpretación de los resultados,

presentación de la investigación (Prácticas de laboratorio, 2009), por lo que puede abordarse una mayor integración de contenido.

Con respecto al tópico que se desarrolla en esta actividad de laboratorio, la propuesta diseñada permite al estudiante visualizar la primera fase de la fotosíntesis, cuando ocurre la fotólisis del agua (Reacción de Hill) y el primer desprendimiento de electrones. El estudiante podría alcanzar una mejor comprensión de dicho proceso tanto en la parte cualitativa como en la cuantitativa, además, de complementar e integrar el contenido teórico con el práctico.

La reacción de Hill se demuestra con el DCPIP (2,6 diclorofenolindofenol). En estado oxidado, este colorante es azul, mientras que reducido no tiene color. Las moléculas del colorante interceptan los electrones en la cadena fotosintética; específicamente acepta dos electrones en lugar de que vayan a P680, por lo que la pérdida del color demuestra que el flujo de electrones está ocurriendo durante las reacciones dependientes de la luz. Dicha pérdida es proporcional al flujo de electrones y puede ser cuantificada en un espectrofotómetro o en un Spectronic.

La reacción sería:



El objetivo fundamental de esta actividad fue diseñar un experimento que permita cuantificar el efecto de algún factor sobre la actividad fotoquímica de cloroplastos, aislados de hojas de espinacas, mediante la determinación de la reducción del colorante 2,6 diclorofenolindofenol en presencia de la luz.

Objetivos específicos

- Aislar y observar por medio del microscopio los cloroplastos de las hojas de espinaca.
- Determinar la actividad fotoquímica de los cloroplastos.

- Determinar el efecto de diferentes intensidades de luz en la actividad fotoquímica de los cloroplastos.
- Determinar el efecto de diferentes longitudes de onda en la actividad fotoquímica de los cloroplastos.
- Determinar el efecto de la temperatura en la actividad fotoquímica de los cloroplastos.

MÉTODO

El desarrollo de la actividad consta de:

Prelaboratorio

Consiste en la discusión de los fundamentos teóricos del proceso de fotosíntesis, asignación de variables a los diferentes grupos, formulación de hipótesis, discusión del diseño experimental y montaje de la curva de calibración del colorante (2,6 diclorofenolindofenol).

Laboratorio

A.- Metodología común:

La actividad de laboratorio es una modificación de las metodologías propuestas por los autores: Hall (1972), Hall y Hawkins (1975), Steucek (1982), y consiste en tres etapas: Aislamiento de los cloroplastos; Observación de los cloroplastos aislados y la Actividad fotosintética de los cloroplastos aislados.

Aislamiento de cloroplastos

- Se pesan 25 gramos de hojas de espinaca y las hojas se cortan en pedazos de 0,5 a 1 cm de largo excluyendo tallos y venas largas.
- Se colocan los pedazos en un mortero previamente enfriado y se agregan 50 ml de Buffer Tris-HCl 0,01 M, pH 7,3 + 0,35 M de NaCl frío. Luego se macera sobre hielo por 2 minutos hasta homogeneizar. El homogeneizado se filtra a través de cuatro capas de gasa. El filtrado se coloca en dos tubos plásticos de centrifuga de mesa, se equilibran para centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos. Se decanta el sobrenadante de esta primera centrifugación en otros dos

tubos de centrífuga y se separa el precipitado (no se debe botar hasta verificar la presencia de cloroplastos en la segunda centrifugada). El sobrenadante se centrifuga al máximo de velocidad en la centrífuga de mesa por un período no menor de 15-20 minutos.

- El sobrenadante de la segunda centrifugada se decanta (no se debe botar hasta asegurarse de la presencia de cloroplastos). En el precipitado de esta segunda centrifugación deben estar los cloroplastos. Recordar trabajar siempre en frío.
- Los dos precipitados son resuspendidos con Buffer Tris-HCl 0,01 M + 0,035 M de Na Cl. Para resuspender, el procedimiento es el siguiente: Añadir 2 ml. de Buffer en cada tubo y con la ayuda de un pincel resuspender los dos precipitados. Unir las dos suspensiones y agregar buffer hasta completar 25 ml de suspensión de cloroplastos. Hacer todo el proceso en hielo.

Observación de cloroplastos

- Tomar una gota de suspensión de cloroplastos y colocarla sobre un porta objeto.
- Colocar el cubre objetos.
- Enfocar el microscopio a 40x.
- Agregar una gota de aceite de inmersión para observar en 100x los cloroplastos.
- Hacer dibujos para anexar en el informe.

La observación de cloroplastos garantiza la presencia de los mismos en el precipitado. La ausencia de ellos indicaría que al centrifugar no precipitaron por lo que todavía se encuentran en el sobrenadante, por lo que habría que volver a centrifugar, ahora por más tiempo.

Actividad Fotosintética de los cloroplastos

- Preparar un tubo blanco que contenga 9,8 ml de Buffer Tris-NaCl, 0,2 ml de suspensión de cloroplastos. Agitar y transferir al tubo de spectronic. Colocar luego en Spectronic y ajustar a cero (0) (Leer a 625 nm).
- Preparar un tubo experimental (control). El tubo debe permanecer envuelto en papel de aluminio. Contiene: 9,3 ml de Buffer Tris-NaCl, 1,4 ml de agua destilada, 0,2 ml de suspensión de cloroplastos y 0,5 ml

de 2,6 diclorofenolindofenol al 0,02%. (Añadir en el orden indicado y verificar el volumen final de 10 ml). Agitar rápidamente, transferir la solución a tubo de Spectronic y de inmediato medir la absorbancia. Esta lectura representa el tiempo cero (0).

- Luego de hacer la lectura, se debe colocar el tubo en un baño de agua en un vaso de precipitado, a 15°C y a 25 cm de una fuente de luz. Posteriormente se tomarán lecturas de ese mismo tubo cada dos minutos durante 14 minutos.

B.- Experimentos con diferentes variables

Experimento 1: Acción de la intensidad de la luz

Esta variable se puede manejar de dos formas distintas: en un caso, se utilizan bombillos de distintas intensidades; en otro caso, se utiliza el mismo bombillo pero a diferentes distancias del tubo experimental. En esta investigación se consideraron las dos opciones.

Se montan 4 tubos con cloroplastos y buffer y se cubren con papel de aluminio. En el tiempo 0, se quita el papel de aluminio, se agrega el colorante y se hace la primera lectura en el Spectronic; luego se colocan a una distancia fija de 10 cm. bombillos de 25, 40, 75 y 100 vatios. Cada dos minutos se toma lectura de absorbancia hasta aproximadamente diez o doce minutos, cuando no hay mayor cambio de absorbancia. Montar el experimento por triplicado disminuye los errores experimentales. En este caso, se mantiene igual la distancia, pero varía la intensidad de los bombillos.

El experimento se repitió a la distancia de 20 cm con los diferentes bombillos. De esta forma se podía comparar la misma intensidad de bombillo a dos distancias diferentes.

Experimento 2: Acción de la temperatura

Se montan 7 tubos con cloroplastos y buffer y se cubren con papel de aluminio. En el tiempo 0, se quita el papel de aluminio, se agrega el colorante y se hace la primera lectura en el Spectronic; luego se colocan

los tubos en un vaso de precipitado a una temperatura controlada frente a un bombillo de 75 vatios, a una distancia de 20 cm. Para controlar la temperatura, se requiere de hielo y de agua hirviendo. De esta manera se pueden utilizar varias temperaturas. En este caso se utilizó: 5,15, 25, 45, 70,90 y 100°C. Cada dos minutos se toma lectura de absorbancia hasta aproximadamente diez o doce minutos cuando no hay mayor cambio de absorbancia. Montar el experimento por triplicado disminuye los errores experimentales. La luz y la distancia son controladas para evitar que se conviertan en variables intervinientes.

Experimento 3: Acción de la Longitud de onda

Se montan 5 tubos con cloroplastos y buffer y se cubren con papel de aluminio. En el tiempo 0, se quita el papel de aluminio, se agrega el colorante y se hace la primera lectura en el Spectronic. El tubo es colocado en la rejilla frente a un bombillo de 75 vatios a 20 cm de distancia. Para lograr diferentes longitudes de onda, los tubos de ensayo utilizados se pintaron con pintura para vidrio. En este experimento se tenían tubos azules, rojos, verdes, morados y amarillos. Cada dos minutos se toma lectura de absorbancia hasta aproximadamente diez o doce minutos cuando no hay mayor cambio de absorbancia. Montar el experimento por triplicado disminuye los errores experimentales. La luz y la distancia son controladas.

Post-laboratorio

Presentación de los resultados experimentales:

- El post-laboratorio y discusión de resultados debe ser una actividad integradora (Lederman, 1984) donde estén incluidos los resultados de todos los grupos, pero además, algunos elementos importantes que pueden ser discutidos en forma grupal a través de las siguientes preguntas:
- ¿Qué es la fotosíntesis? ¿Qué son reacciones dependientes de la luz y no dependientes de la luz?
- ¿Por qué debe homogeneizarse la muestra antes de centrifugar?

- ¿Por qué se debe centrifugar dos veces?
- ¿Por qué se debe trabajar en frío?
- ¿Por qué se utilizan dos concentraciones diferentes de NaCl durante el experimento?
- ¿Qué es una sustancia reductora? ¿Qué es una sustancia aceptora de electrones?
- ¿Qué es pH? ¿Qué significa que el pH sea alto o bajo? ¿Qué significa que sea ácido o básico?
- ¿Para qué se hace una curva de calibración con el colorante?
- ¿Cuáles son los diferentes factores que influyen sobre la fotosíntesis?
- ¿Por qué aquí no se cumple que a mayor temperatura, mayor velocidad fotosintética (hasta cierto punto)?
- ¿Por qué los tubos deben permanecer envueltos en papel de aluminio hasta comenzar las mediciones?
- ¿Cómo se está cuantificando el proceso fotosintético?
- ¿Por qué se recomienda que los tubos estén inmersos en un baño de agua?
- ¿Cuál es el rol que juega un inhibidor como el cloruro de amonio en este proceso?
- ¿Por qué la longitud de onda es un factor importante a considerar en el proceso fotosintético?
- ¿Cuál es el papel de los cloroplastos en la fotosíntesis?
- ¿Cuál es el papel del colorante 2,6 diclorofenolindofenol?
- ¿Qué es la reacción de Hill?

Evaluación del laboratorio de fotosíntesis

La presentación oral, el prelaboratorio y el laboratorio son evaluados cuantitativamente. Se hace un análisis de la nota global del laboratorio de fotosíntesis desde el semestre 2006I hasta el semestre 2009II.

Reflexión. Finalizada la actividad, se pide a los estudiantes una reflexión basada en preguntas específicas:

- ¿Te gustó el ejercicio?
- ¿Te parece que complementa lo explicado en teoría? Explica tu respuesta

- ¿Te ayudó a entender mejor el proceso?
- ¿Tuviste que buscar mucha información para entenderlo?
- ¿Fue importante la discusión en clase?
- ¿Crees que deben realizarse ejercicios como éste para la comprensión de algunos procesos de biología celular?
- ¿Consideras que la actividad es factible para aplicarla a nivel e bachillerato?
- ¿Modificarías la actividad? En caso afirmativo ¿Cómo?

Si tienes algún comentario adicional puedes agregarlo.

Las reflexiones recogidas en los diferentes semestres son interpretadas a través del análisis de contenido.

RESULTADOS

Laboratorio

Curva de calibración: Esta curva se construye y permite interpolar los valores de absorbancia para llevarlos a microgramos de colorante (2,6 diclorofenolindofenol); se muestra a continuación.

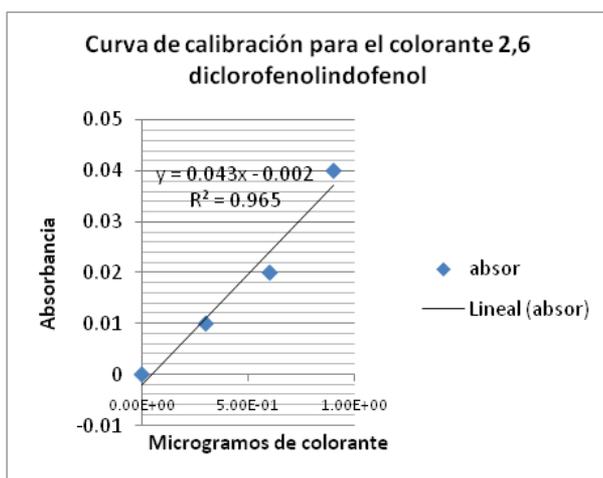


Grafico 1. Curva de calibración del colorante 2,6 diclorofenolindofenol

Experimento 1. Acción de la intensidad de la luz

Se recogen los datos de absorbancia por diez minutos y luego se resta el último valor del primero para ver el cambio de absorbancia. Debe disminuir en función de que el colorante 2,4 diclorofenolindofenol se esté reduciendo como muestra de la actividad fotosintética. Ese valor es llevado a la curva de calibración para determinar su equivalente en microgramos de colorante reducido. De esta forma se construye el gráfico de microgramos de colorante reducidos por acción de la intensidad de luz.

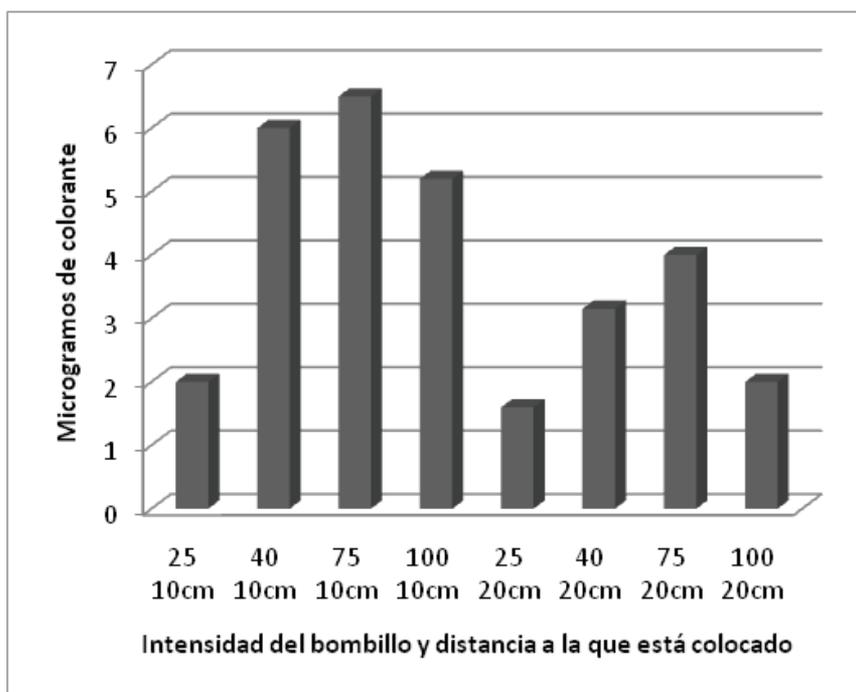


Gráfico2. Efecto de la intensidad de la luz sobre la reducción del colorante 2,6 diclorofenolindofenol

Los resultados en cuanto a la intensidad representan un promedio de varios montajes experimentales (8). Se puede observar que mientras mayor es la intensidad del bombillo, mayor es la cantidad de colorante

reducido, pero sólo hasta 75 vatios. Tanto a la distancia de 10 cm como a la distancia de 20 cm, la actividad disminuye a 100 vatios de intensidad. Igualmente es importante destacar la importancia del factor intensidad en el proceso ya que a la distancia de 10 cm la reducción del colorante es mayor que a 20 cm lo cual es notoriamente visible en el gráfico mostrado. A 100 vatios lo que pudiera estar ocurriendo es que la intensidad del bombillo, provoca un desprendimiento de calor que pudiera calentar el tubo y por ende, las enzimas alcanzan una temperatura muy alta rápidamente lo que podría alterar su conformación y su comportamiento. Si se controla la temperatura del tubo y la actividad sigue baja a 100 vatios, la razón es que el exceso de luz desactiva el fotosistema II por degradación de una proteína del complejo (Tema 13, 2010; Fisiología Vegetal, 2010). Quedaría por determinar si a 100 vatios se llega a este exceso. La razón de manejar dos distancias fue considerar si la proporción de actividad se mantiene con el mismo bombillo. Puede observarse que con una misma intensidad, la reducción de colorante es menor si la distancia es mayor; por tanto, se puede trabajar con un bombillo a diferentes distancias como patrón de intensidad de la luz.

Experimento 2. Acción de la temperatura

Se recogen los datos de absorbancia por diez minutos y luego se resta el último valor del primero para ver el cambio de absorbancia. Debe disminuir en función de que el colorante 2,4 diclorofenoindofenol se esté reduciendo como muestra de la actividad fotosintética. Ese valor es llevado a la curva de calibración para determinar su equivalente en microgramos de colorante reducido. De esta forma se construye el gráfico de microgramos de colorante reducidos por acción de la temperatura que se muestra a continuación.

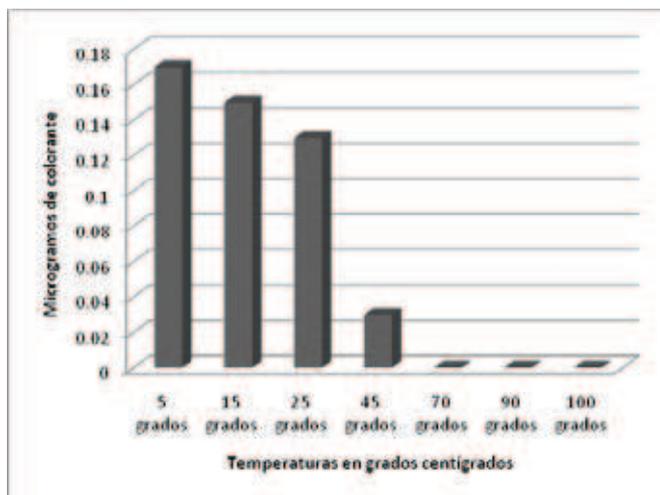


Gráfico 3. Efecto de la temperatura sobre la reducción del colorante 2,6 diclorofenolindofenol

Los resultados (seis repeticiones) muestran que la temperatura óptima para la actividad fotosintética está entre los 5 y 25°C en todas las repeticiones realizadas. A partir de esa temperatura comienza una disminución de la actividad la cual se hace muy notoria desde los 40°C; a partir de los 70°C no hay reducción del colorante. La razón podría deberse a la conformación de las proteínas y la temperatura. Todas las proteínas tienen una temperatura óptima de actividad y por encima de ella, su conformación se altera hasta llegar incluso a la desnaturalización cuando ya no pueden interactuar con su respectivo sustrato. Los resultados coinciden con las referencias que recomiendan realizar este experimento a 15°C; se esperaría que esta temperatura es la óptima; sin embargo, la espinaca es una planta de temperaturas templadas; de hecho la información sobre el cultivo de esta planta, señala que la temperatura óptima es alrededor de 5°C, lo cual concuerda con los resultados encontrados en diversas repeticiones (El cultivo de la espinaca, 2010). Pero como la temperatura óptima del experimento es de 15°C, se ha considerado que el rango aceptable para estos resultados, está entre 5 y 20°C, considerando condiciones de la espinaca y otras variables intervinientes.

En cuanto a las temperaturas elevadas, la literatura señala que la temperatura óptima en las plantas C3 es más baja que en las plantas C4; esto apoya los resultados encontrados con la espinaca, la cual es también una planta C3 (Tema 13, 2010; Fisiología vegetal, 2010). La razón es la enzima RUBISCO. Esta enzima tiene dos actividades: como oxigenasa y como carboxilasa. Como oxigenasa, las reacciones se dirigen a la fotorespiración. Como carboxilasa, las reacciones se dirigen a la fase no dependiente de la luz de la fotosíntesis. Cuando la temperatura es superior a los 25°C, el oxígeno se hace más soluble que el dióxido de carbono, por lo que la reacción se desplaza hacia fotorespiración (Tema 13, 2010; Fisiología vegetal, 2010).

Experimento 3. Acción de la longitud de onda

Se recogen los datos de absorbancia por diez minutos y luego se resta el último valor del primero para ver el cambio de absorbancia. Debe disminuir en función de que el colorante 2,4 diclorofenolindofenol se esté reduciendo como muestra de la actividad fotosintética. Ese valor es llevado a la curva de calibración para determinar su equivalente en microgramos de colorante reducido. De esta forma se construye el gráfico de microgramos de colorante reducidos por acción de la longitud de onda que se muestra a continuación.

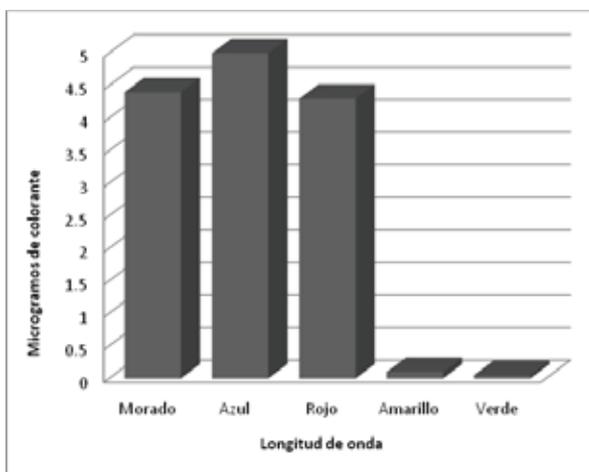


Gráfico 4. Efecto de la longitud de onda sobre la reducción del colorante 2,6 diclorofenolindofenol

En este caso, la mayoría de las repeticiones de este experimento coinciden con la literatura en cuanto a que la mayor actividad fotosintética se da bajo la luz morada, azul y roja. Cuando se mide el efecto de diferentes longitudes de onda sobre la tasa fotosintética se obtiene el espectro de acción, el cual sirve para identificar los pigmentos implicados; todas las especies presentan un pico principal en la región correspondiente al rojo y uno menor en el azul (Fisiología vegetal (b), 2010). Más aún, Emerson y su grupo de investigadores encontraron que el proporcionar luz roja de longitud de onda corta al mismo tiempo que longitudes de onda más largas, la tasa de fotosíntesis era mayor que la suma de las tasas de fotosíntesis, originada por una sola clase de longitud de onda. A esta sinergia se le ha llamado efecto Emerson; pareciendo que una luz dependiera de la otra para ser altamente eficiente. Actualmente se ha reconocido que en la fotosíntesis cooperan dos grupos de pigmentos o fotosistemas y que las longitudes de onda larga son absorbidas sólo por el fotosistema I. El fotosistema II absorbe longitudes de onda menores a 690 nm; y para una máxima eficiencia debe cooperar con el fotosistema I (LibroBotánicaOnline, 2010).

Considerando el efecto Emerson, se espera que el tubo violeta tenga una actividad mayor que el del azul y el rojo. En algunas repeticiones, se ha dado la situación ideal, pero, en otros casos, los resultados son como los señalados en el gráfico anterior; de hecho, es muy frecuente, que el azul de mayor reducción del colorante que el morado pudiendo explicarse por condiciones experimentales.

En cuanto al amarillo y verde, la cantidad de colorante reducido es muy baja como la representada en la gráfica. Sin embargo, en algunas repeticiones, el tubo de color amarillo, reflejó una pequeña reducción de colorante. En ese caso, la posible explicación pudiera estar en la capacidad de la clorofila de absorber la luz en longitudes de onda cercanas al amarillo, o, a la presencia de otros pigmentos que también son capaces de absorber la luz (xantofilas y carotenos). Al respecto, la literatura señala que la clorofila absorbe las longitudes de ondas violeta, azul, anaranjado-rojizo, rojo y pocas radiaciones de las longitudes de onda intermedias

(verde-amarillo-anaranjado). Los carotenoides absorben la longitud de onda azul y un poco en el verde; estos pigmentos tienden a ser rojos, amarillos o anaranjados. La clorofila b absorbe en el azul, en el rojo y en el anaranjado del espectro (con longitudes de ondas largas y baja energía). La parte media del espectro compuesta por longitudes de onda amarilla y verde es reflejada y el ojo humano la percibe como verde (Libro Botánica Online, 2010).

Post-laboratorio

Presentación de resultados

La presentación de los resultados se hace por medio de la V de Gowin. Son exposiciones orales con todos los estudiantes. Al final, se integra la información para relacionar los factores que afectan la actividad fotosintética. De las múltiples experiencias de post-laboratorio (ocho semestres) se ha podido recoger la siguiente información:

- Es importante la realización de un pre-laboratorio como preparación al trabajo experimental. El pre-laboratorio incluye la discusión de las hipótesis para cada variable, la metodología a seguir y los fundamentos teóricos necesarios para la comprensión de la actividad. De esta manera, se integra la teoría a la práctica y se prepara al estudiante para el trabajo de laboratorio por lo que tiene idea de los posibles resultados a obtener.
- La interrelación de los factores permite explicar mejor los resultados. Así, la presentación de los datos de temperatura señalan que la experiencia es óptima a temperaturas bajas. Esto permite explicar que en el caso de intensidad de la luz, el bombillo de 100vatios podría estar calentando el tubo y por eso la actividad no es óptima; en este caso, la temperatura resulta ser una variable interviniente por lo que recomiendan dos opciones: trabajar con un bombillo de mayor vatios y mantener los tubos en un baño de agua a fin de controlar la temperatura.
- La práctica semi-estructurada permite ejemplificar lo que en realidad ocurre en investigación experimental. Algunos experimentos funcionan más rápido, otros hay que repetirlos e incluso hay que hacer ajust-

es de última hora como en el caso de los volúmenes a utilizar de cloroplastos y de colorante. Todo esto contribuye a quitar la idea de que los experimentos son siempre exitosos; en realidad, a veces pueden llevarse muchas repeticiones para llegar a estandarizar un método o para poder confiar en los resultados.

- El estudiante toma su variable y trata de investigar todo aquello que pueda estar relacionado con el comportamiento de la misma. A la hora de exponer sus resultados, no viene a ser evaluado o juzgado por el docente o por sus compañeros. En realidad, su exposición es un proceso de aprendizaje en cuanto a si su investigación resultó adecuada, si la supo relacionar con sus resultados, si sus resultados son coherentes con lo explicado y si su exposición fue comprendida por todos. En este caso hay un proceso de aprendizaje cooperativo tanto en la forma como en el fondo de la presentación de los resultados.

Evaluación del laboratorio de fotosíntesis

La calificación global de este laboratorio representa un puntaje de 6, 7 u 8 puntos de los 100 de la asignatura en los diferentes semestres considerados. Para efectos de comparación se manejará en porcentaje:

Semestre	Calificación obtenida en fotosíntesis en porcentaje
2006I	81,25%
2006II	67%
2007I	67%
2007II	60,75%
2008I	73,28%
2009I	74,44%
2009II	79%

Desde el semestre 2006II se observa un incremento en la calificación obtenida, lo cual puede explicarse por la experiencia adquirida por los docentes en el manejo del laboratorio, en la mejor comprensión de la actividad por parte de los preparadores, en la incorporación del pre-laboratorio que implica una mejor preparación para los estudiantes al momento de realizar su práctica. A medida que se ha implementado la práctica, se

han corregido los aspectos negativos, lo que se evidencia en una mejor calificación y, quizás, en un mejor aprendizaje del tópico considerando que esta calificación engloba varios aspectos tal como fue señalado en la metodología. Este incremento sugiere a los investigadores la necesidad de seguir implementado esta actividad y trabajar en el diseño de otras nuevas para tópicos que ofrecen gran dificultad a los estudiantes en esta asignatura.

En cuanto al resultado del semestre 2006-I, es necesario aclarar el resultado. En esa oportunidad, sólo había en la cátedra una profesora de la asignatura quien a su vez fue la investigadora que aplicó el ensayo piloto junto con el preparador. Esa doble función, además de múltiples ensayos por parte del preparador asignado, permitió supervisar la actividad en toda su extensión para su funcionamiento y el logro de los objetivos.

Para los siguientes semestres, se ha anexado nuevo personal investigativo tanto docentes como preparadores, lo que implicó el entrenamiento a la actividad. Mientras se han ido incorporando y preparando estos nuevos investigadores, se ha podido corregir el aspecto de entrenamiento por lo que se ha agregado una sección de recomendaciones para que otras personas puedan aplicar la actividad sin mayores problemas. Esto evidencia que con entrenamiento previo al docente, la actividad puede ser útil tanto para el docente que la dirija, como para los estudiantes involucrados en el aprendizaje del tópico.

Reflexiones

De las reflexiones recogidas en los diferentes semestres, se hizo análisis de contenido (Delgado, 2000; Hernández, Fernández y Baptista, 2006). Dicho análisis se organizó en esquemas:

- Conocimientos manejados, características de la estrategia, beneficios de la estrategia y sugerencias propuestas para el laboratorio de fotosíntesis.
- Impacto motivacional de la estrategia.

A continuación se coloca un esquema que resume los aspectos anteriores:



Esquema 1. Resultados del Análisis de Contenido de las reflexiones realizadas por los estudiantes

Tal como se puede observar en el esquema, los estudiantes opinan que la actividad permite manejar conocimientos de la teoría, por lo que se facilita la integración de la teoría y la práctica, lo cual a veces resulta difícil de lograr. Respecto a las características de la actividad, algunos señalan que es muy larga; sin embargo, el tiempo de duración ha disminuido en los últimos semestres gracias al pre-laboratorio que permite que el estudiante sepa lo que va a realizar por lo que hay menos pérdida de tiempo. La mayoría de los estudiantes señalan que la actividad es llamativa, innovadora, eficaz, excelente, interesante, fácil de llevar a otros niveles, útil para evidenciar fotosíntesis y para el aprendizaje.

En cuanto al impacto motivacional, los estudiantes señalan que promueve el conocimiento del proceso fotosintético, promueve la discusión para corregir errores, promueve el cooperativismo con el preparador en el momento del laboratorio y cooperativismo con sus compañeros, promueve desarrollo de habilidades y destrezas.

Finalmente, presentan sugerencias para la inclusión de otras variables, el uso de otra planta y la aplicación de actividades como ésta para la formación docente en la enseñanza de las ciencias.

CONCLUSIONES

La actividad fotosintética puede medirse cuantitativamente a través de la reducción del colorante diclorofenolindofenol.

- La actividad fotosintética está condicionada por una serie de factores que son los que finalmente establecen la efectividad del proceso.
- La espinaca es una planta de temperaturas templadas lo que explica que su actividad óptima esté a bajas temperaturas. De hecho se nota disminución de la actividad desde los 30°C.
- La intensidad de luz parece tener un óptimo en la actividad fotosintética en 75 vatios. Queda por determinar si a 100 vatios hay una interferencia con la temperatura que alcanza el tubo.
- La longitud de onda es otro factor relevante en la actividad fotosintética. Quedó evidenciado que la actividad es óptima en azul, rojo y violeta tal como lo reporta la literatura.
- La actividad presentada facilita la integración de la teoría con el laboratorio y el aprendizaje cooperativo e individual.
- La modalidad de la práctica semi-estructurada, la cual incorpora diferentes situaciones problemáticas, permite al estudiante obtener un conocimiento más global e integrador del evento estudiado y una visión más real del método científico.

Notas y Sugerencias

- El Buffer Tris puede ser sustituido con buffer potasio fosfato.
- Los tubos con cloroplastos y colorante cambian de color pero nunca se pondrán transparentes por el color de la clorofila.
- Se sugiere hacer un patrón con solución de cloroplastos para determinar cuánto debe ser el volumen de solución de cloroplastos (0,2 ml; 0,5 ml; 1ml) y el volumen de colorante (0,1; 0,3; 0,5 ml) para la mejor observación del efecto de la variable en el experimento a realizar. Puede hacerse en el momento de la práctica o el día antes.

- Se puede trabajar a temperatura ambiente sin necesidad de baño de agua siempre y cuando la temperatura no supere 22-25° C.
- Para la parte experimental semi estructurada pueden utilizarse otras variables:
 - a. Usar un inhibidor como el cloruro de amonio. Las concentraciones pueden ser: 1N: 0,1N; 0,01N.
 - b. Usar diferentes longitudes de onda. Alternativas: probar la diferencia entre el uso de bombillos de color, varias capas de papel celofán (3, 4, 5), o tubos de ensayo pintados con pintura para vidrio.
 - c. Usar diferentes pH desde el rango ácido hasta el rango básico

REFERENCIAS

- Delgado, C. (2000). *Introducción al análisis de datos*. Segmento mimeografiado de Tesis Doctoral (no publicada)
- Infoagro [Publicación en línea] Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/espinaca.htm>. [Consultado el 06 de Agosto de 2010]
- Ferney, W. (2004). Prácticas de Laboratorio en ingeniería: Una estrategia efectiva de aprendizaje. *Revista Ciencias.com* Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEpkEAKpkFaFUCDvoy.php> [Consultado 17 de mayo de 2009]
- Fisiología Vegetal. II. Fijación de CO₂ y Fotorespiración. [Publicación en línea] Disponible en: http://bioloweb.comli.com/apuntes_txt/fv/06.Metabolismo_fijacion_CO2.pdf [Consultado el 06 de Agosto de 2010]
- Fisiología Vegetal (b). 2.7. Absorción de luz. [Publicación en línea]. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Disponible en: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/02_07.htm [Consultado el 06 de Agosto de 2010]
- Freifelder, D. (1993). *Essentials of Molecular Biology*. Second edition. George M. Malacinski (Ed.). Boston, Jones and Bartlett Publishers.
- Funkhouser, E. and Balin, D. (1994). The Hill Reaction: In Vitro and In Vivo Studies. Association for Biology Laboratory Education (ABLE). [Publicación en línea] Disponible en: <http://www.zoo.utoronto.ca/able2.1994.Chapter7.p109-118> [Revisado 16 de mayo de 2009]
- Hall, D. O; Rao, K. (1972). Photosynthesis. Studies and Biology Series. N° 37.

Edgard, Arnold. London

Hall, D. Hawkins, S. (1975). *Laboratory Manual of Cell Biology*. The English University Press. Ltd. P 176-178

Hernández, R; Fernández, C. y Baptista, P. (2006). *Metodología de la Investigación*. Cuarta Edición. México, McGrawHill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.

Las prácticas de laboratorio Importancia, diseño y elaboración. 2009. [Documento en línea] Disponible en: www.angelfire.com/trek/biometriaygenetica/practicas.(2009) [Consultado 17 de mayo de 2009]

Lederman, L. (1984). Debriefing. A critical reexamination of the postexperience analytic process with implications for its effective use. *Simulation and games*. 15 (4): 415-431

LibroBotánicaOnLine. Fotosíntesis. [Publicación en línea] Disponible en: <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/fotosintesis/>. [Revisado el 06 de Agosto de 2010]

Steucek, G y R. Hill. (1982). Photosynthesis. An assay utilizing leaf disks. *The American Biology Teacher*. 47(2): 96-99.

Tema 13. Aspectos eco fisiológicos de la fotosíntesis y la respiración. [Documento en línea] [Consultado el 06 de Agosto de 2010] Disponible en: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/FisioVegetal/TeoriaFisioVegetal/Resumenes/tema13.htm

Whittingham, C.P. (1976). *El mecanismo de la Fotosíntesis*. Editorial H. Blume Ediciones. Primera Edición. España-Madrid