



Mestrado em Química em Contexto Escolar

Metais, Ambiente e Vida

Interferência do Vanádio nos sistemas vivos e sua contextualização no ensino das Ciências Experimentais

Tese de Mestrado

Realizado por:

Paulo Jorge Rocha Ruivo

Orientadores:

Professor Doutor Rui Ferreira (Departamento de Química/Universidade de Évora)

Professora Doutora Isabel Alves-Pereira (Departamento de Química/Universidade de Évora)

Évora

2010

A principal diferença entre a abordagem tradicional do trabalho laboratorial e o trabalho experimental de natureza investigativa, é o grau de envolvimento dos alunos na compreensão “do fazer”.

Watson, 1993

Agradecimentos

Agradeço especialmente aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Ferreira e Professora Doutora Isabel Alves-Pereira, do Departamento de Química da Universidade de Évora, pelo excelente apoio prestado para o desenvolvimento desta tese, sem o qual, não teria sido possível a sua concretização.

Agradeço também às professoras Ana Paula Bento e Conceição Pereira, da Escola Secundária Dom Manuel Martins, Setúbal, pelo interesse demonstrado pelas actividades experimentais desenvolvidas pelos alunos e o incentivo que me foram dando para o seu cumprimento.

O apoio dado pela D. Matilde da Escola Secundária Dom Manuel Martins, Setúbal, foi também importante no que concerne à manutenção do material utilizado.

Dou um agradecimento particular aos vinte e sete alunos envolvidos e respectivos encarregados de educação, pelo interesse e empenho revelado durante as actividades realizadas.

Agradeço ainda ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) pelo apoio financeiro; ao Departamento de Química da Universidade de Évora, assim como, à Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal, pelo espaço, equipamento e reagentes disponibilizados.

Índice

Índice de figuras	IX
Índice de quadros	X
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XV
Parte I – A aula	XVII
1. <i>Problema</i>	1
2. <i>Objectivos</i>	2
2.1. Objectivo geral.....	2
2.2. Objectivos específicos	2
2.2. Objectivos funcionais	3
3. <i>Competências gerais a desenvolver</i>	4
4. <i>Metodologia</i>	5
4.1. Estratégias	7
4.1.1. Estratégia experimental	7
4.1.2. Estratégia pedagógica	8
4.2. Procedimento experimental.....	10
4.2.1. Trabalho desenvolvido pelo mestrando.....	11
4.2.1.1. Cuidados de assepsia em microbiologia	11
4.2.1.2. Material Biológico.....	12
4.2.1.3. Meios de cultura	12
4.2.1.4. Acompanhamento do crescimento da cultura	13
4.2.1.5. Exposição ao metavanadato de amónio.....	13
4.2.1.6. Obtenção dos lisados celulares.....	13
4.2.1.7. Obtenção do sobrenadante pós-12000 g	13
4.2.1.8. Determinação do conteúdo em proteínas.....	14
4.2.1.9. Determinação da actividade fosfatase alcalina	14
4.2.2. Trabalho desenvolvido com os alunos	15
4.2.2.1. Preparação do meio YPD líquido, e dos meios sólidos YPD e YPD-V	15
4.2.2.2. Inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez.....	16
4.2.2.3. Inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h.....	17
4.2.2.4. Extração do enzima ALP de leveduras crescidas nos diferentes meios sólidos	17
4.2.2.5. Determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry	17
4.2.2.6. Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP).....	19
4.2.3. Análise estatística das competências desenvolvidas pelos alunos e grau de satisfação	20
4.3. Organigrama	21
4.4. Reagentes	22
4.5. Material	22
4.6. Equipamento	23
4.6.1. Laboratorial	23
4.6.1. Audio-visual.....	23
5. <i>Resultados e discussão</i>	24
5.1. Resultados obtidos pelo mestrando.....	24

5.2. Resultados obtidos pelos alunos.....	28
5.3. Competências desenvolvidas pelos alunos e grau de satisfação	37
6. Conclusões	43
Parte II - Texto de apoio	45
1. <i>Propriedades físico-químicas do vanádio.</i>	47
1.1. Importância dos metais de transição nos sistemas vivos.	47
1.2. Localização do vanádio na tabela periódica.....	47
1.3. Valência e estados de oxidação.	47
1.4. Actividade biológica do vanádio.	47
1.5. Toxicidade do vanádio pentavalente.	48
1.6. Vanádio e ambiente.	49
2. <i>Propriedades físico-químicas do metavanadato de amónio.</i>	49
2.1. Reactividade do metavanadato de amónio.	49
2.2. Aplicações do metavanadato de amónio na vida quotidiana.	49
2.3. Toxicidade do metavanadato de amónio nos sistemas vivos.	49
3. <i>Caracterização biológica de S. cerevisiae.</i>	50
3.1. Classificação taxonómica.	50
3.2. Importância da <i>S. cerevisiae</i> como modelo biológico.	50
4. <i>Soluções tampão</i>	51
4.1. Equação de Hendersen – Hasselbalch.....	51
4.2. Aplicações.	51
5. <i>Lei de Beer – Lambert.</i>	51
5.1. Enunciado e equação matemática.	51
5.2. Limites de aplicabilidade.....	52
5.3. Erros sistemáticos e erros acidentais.	52
6. <i>Cinética enzimática</i>	53
6.1. Introdução à cinética química.	53
6.2. Equação Michaelis - Menten.....	53
6.3. Factores que afectam a actividade enzimática.	53
6.4. Caracterização estrutural e funcional da fosfatase alcalina.....	54
6.5. Importância biológica da fosfatase alcalina.	55
Referências bibliográficas	57
ANEXOS	
I. <i>Segurança laboratorial</i>	63
II. <i>Cálculos</i>	64
2.1. Preparação de soluções aquosas de metavanadato de amónio	64
2.2. Preparação de solução tampão fosfato 10 mM, pH=7.....	64
III. <i>Materiais pedagógicos, propostas de actividades experimentais apresentadas aos alunos, avaliação de competências, critérios de correcção e resultados da avaliação</i>	66
3.1. Preparação de meios YPD líquido e dos meios sólidos YPD e YPD-V (a).....	66
3.2. Inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez (b).....	73

3.3. Inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h (c)	80
3.4. Extracção do enzima ALP de leveduras crescidas em diferentes meios sólidos (d)	86
3.5. Determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry (e)	92
3.6. Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) (f)	100
IV. Auto-avaliação e grau de satisfação dos alunos.....	108
V. Tratamento estatístico	113

Índice de figuras

PARTE I

Figura 4.1. Reacção da fosfatase alcalina com o substrato sintético p-NPP.....	14
Figura 5.1. Curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃ obtida a 28°C a partir de leituras de turbidez a 640 nm. Cada ponto representa a média aritmética de três replicados ± desvio-padrão.....	25
Figura 5.2. Curva de calibração A _{720nm} vs [proteína] traçada utilizando BSA como proteína padrão, tendo em vista a quantificação de proteínas na fracção celular pós-12000 g, obtida a partir homogeneizados celulares de <i>S cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas em meio YPD, a 28°C, durante 72 h.....	26
Figura 5.3. Efeito do metavanadato de amónio no conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g, de homogeneizados celulares de <i>S cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V, a 28°C, durante 72 h. Os resultados representam a média de três experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,01). Análise ANOVA I seguida pelo teste de Tuckey.	26
Figura 5.4. Curvas de reacção A _{405nm} vs t traçada para o enzima ALP presente na fracção celular pós-12000 g, obtida a partir homogeneizados celulares de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V contendo 25 mM ou 75 mM de V ₂ O ₅ , a 28°C, durante 72 h, utilizando o p-NPP como substrato sintético.	27
Figura 5.5. Efeito do metavanadato de amónio na actividade específica ALP do sobrenadante pós-12000 g, de homogeneizados celulares de <i>S cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V, a 28°C, durante 72 h. Os resultados representam a média de três experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,01). Análise ANOVA I seguida pelo teste de Tuckey.	28
Figura 5.6. Alguns passos da preparação dos meios YPD líquido e sólido, YPD-V, por elementos pertencentes ao grupo I.....	29
Figura 5.7. Cultura em meio líquido YPD de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ (A) e acompanhamento do crescimento da levedura por leitura da turbidez _{640nm} (B) por alunos pertencentes ao grupo I.	30
Figura 5.8. Registo dos valores de turbidez _{640 nm} de cultura em meio YPD líquido de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ a 28 °C, por alunos pertencentes ao grupo I.....	30
Figura 5.9. Inoculação de meio sólido YPD-V com <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ (A), incubação de culturas de levedura em incubadora com temperatura controlada a 28°C (B), seguida pela determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos (C), tarefas realizadas por alunos pertencentes ao grupo I.	31
Figura. 5.10. Recolha de células a partir dos diferentes meios de crescimento (A), células sedimentadas (B-C), desintegração celular por ultra-sons (D-E) e fraccionamento celular por centrifugação diferencial para obtenção do sobrenadante pós-12000 g enriquecido em ALP (F), realizado pelo grupo I.....	31

Figura 5.11. Evidências de operações laboratoriais para a obtenção da curva de calibração de BSA tendo em vista a quantificação de proteínas no sobrenadante pós-12000 g. Preparação do reagente de Lowry (A); Preparação de soluções-padrão com concentração crescente de BSA e amostras do sobrenadante pós-12000 g (B); Gradiante de cor característico da curva de calibração pelo método de Lowry (C); Coloração das amostras do sobrenadante pós-12000 g (D).	32
Figura 5.12. Resultados experimentais obtidos pelos alunos recorrendo ao método de Lowry para a quantificação de proteínas. Valores de A_{720nm} de cada solução-padrão registados pelos estudantes (A), curva de calibração gerada por regressão linear dos resultados obtidos a partir de cada solução-padrão (B).....	33
Figura 5.13. Efeito do metavanadato de amónio no conteúdo proteico dos sobrenadantes pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas na ausência e na presença do metal.	34
Figura 5.14. Evidências de operações laboratoriais para a obtenção da curvas de reacção para a determinação da actividade enzimática ALP, utilizando o p-NPP como substrato, tendo em vista a quantificação deste enzima no sobrenadante pós-12000 g.	34
Figura 5.15. Resultados experimentais obtidos pelos alunos na determinação da actividade ALP. Curvas de reacção A_{405nm} vs t traçadas para o enzima ALP presente na fracção celular pós-12000 g, obtida a partir homogeneizados celulares de <i>S cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas em meio YPD, na ausência e na presença de metavanadato de amónio, a 28 °C, durante 72 h, utilizando o pNPP como substrato sintético.....	35
Figura 5.16. Efeito do metavanadato de amónio sobre a actividade específica ALP presente no sobrenadante pós-12000 g, obtido a partir de homogeneizados celulares de <i>S cerevisiae</i> UE-ME ₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V, a 28°C, durante 72 h.	36
Figura 5.17. Análise estatística dos resultados antes e após a acção, expressa em %, os resultados representam a média aritmética da avaliação de todas as respostas \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).	37
Figura 5.18. Análise dos resultados experimentais, aplicada à pontuação obtida em cada uma das seis fases da actividade experimental (a, b, c, d, e, f) recorrendo a ANOVA I. Os pontos de uma mesma fase assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).	38

PARTE II

Figura 2.1. Proposta de um mecanismo de acção do vanadato. CAT, catalase; PV, peroxovanadato; SOD, superóxido dismutase. <i>Adaptado de Capella et al (2002)</i>	48
Figura 2.2. Fosfatase alcalina na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Adaptado de Klionsky (1989)</i>	54

Índice de quadros

PARTE I

Quadro 5.1. Avaliação do grau de satisfação dos alunos. (A) Sucesso da concretização da actividade desenvolvida com os alunos.	40
Quadro 5.2. Avaliação do grau de satisfação dos alunos. (B) Grau de concordância.	41

PARTE II

Quadro 1.1. Classificação taxonómica de <i>S. cerevisiae</i> segundo a NCBI.	50
--	----

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

A	Absorvência
ALP	Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
ATP _{ase}	Adenosinatrifosfatase (EC 3.6.1.3)
b	Percurso óptico
BSA	Albumina do soro bovino
C	Concentração molar
CAT	Catalase (EC 1.11.1.6)
CPY	Carboxipeptidase Y (EC 3.4.16.5)
DO	Densidade óptica ou turbidez
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>generally recognized as safe</i>
GSH	Glutathione
m _p	Massa de proteína
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
P	Potência da radiação transmitida
PHO8	Gene YDR481C (ID 852092)
p-NPP	para-nitrofenilfosfato
P ₀	Potência da radiação incidente
K _m	Constante de Michaelis
PrA	Protease A (EC 3.4.21.3)
PrB	Protease B (EC 3.4.21.83)
PV	Peroxovanadato
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
Svp26p	Yhr181wp (Basic Protein Information)
Tris	tris (hidroximetil) aminometano – tampão
U	Actividade específica
v	Velocidade de reacção

v_{\max}	Velocidade máxima de reacção
v_0	Velocidade inicial de reacção
V_0	Actividade enzimática
ε	Coefficiente de absorvidade

Resumo

Paulo Jorge Rocha Ruivo (2010) **Metals, Ambiente e Vida - Interferência do Vanádio nos sistemas vivos e sua contextualização no ensino das Ciências Experimentais** Tese de Mestrado (R. Ferreira e I. Alves-Pereira, orientadores) Universidade de Évora, Évora, Portugal.

A actividade aqui descrita teve como objectivo aproximar alunos do ensino secundário a uma abordagem fisiológica e molecular sobre os efeitos dos metais nos seres vivos. Os alunos ficaram familiarizados com abordagens teóricas e experimentais que permitiram avaliar o crescimento celular por observação qualitativa, determinação do conteúdo proteico e da actividade específica fosfatase alcalina (ALP), recorrendo a centrifugação diferencial, leituras de absorvência e tratamento informático dos resultados. Os estudantes concluíram que a presença de metavanadato de amónio inibiu o crescimento da levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, causando um decréscimo significativo do conteúdo proteico e da actividade específica ALP, um marcador da proliferação celular. A avaliação de competências adquiridas, bem como, os inquéritos de opinião mostraram que a maior parte dos alunos do 10º e 12º ano da Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal, envolvidos nesta acção, atingiram com sucesso e satisfação os objectivos previamente traçados, revelando uma aprendizagem significativa.

Abstract

Paulo Jorge Rocha Ruivo (2010). **Metals, Environment and Life - Influence of vanadium in living systems and their contextualization in the teaching of experimental sciences**. Master's thesis (R. Ferreira. and I. Alves-Pereira, advisers) University of Évora, Évora, Portugal.

The work described here aimed to bring high school students to a physiological and molecular approach on the effects of metals in living organisms. The students were familiar with theoretical and experimental approaches that allowed them to evaluate cell growth by qualitative observation, protein contents and alkaline phosphatase (ALP) determination, using differential centrifugation, absorbance readings and computational analysis of data. The students concluded that the presence of ammonium metavanadate inhibited the wine-wild yeast *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ growth, and cause a significant decrease of protein content and ALP specific activity, a cell proliferation marker. The assessment of acquired skills, as well as opinion surveys showed that the vast majority of students of 10th and 12nd years of High School Dom Manuel Martins of Setúbal, involved in this project have reached with success and satisfaction the goals previously set for this action and reveals a significant learning.

Parte I – A aula

1. Problema

A contaminação da água, dos solos e dos alimentos com vanádio, podem ser factores que contribuem para a absorção em excesso desse elemento pelos seres vivos. Os níveis de vanádio detectados nos combustíveis fósseis são elevados, pelo que em zonas industriais ou de elevado tráfego rodoviário, a contaminação atmosférica pode ser relevante. É também um elemento constituinte de algumas ligas metálicas, como o aço inoxidável estando igualmente presente em óxidos metálicos utilizados na pigmentação de garrafas, facto que leva ao aumento da sua concentração em algumas bebidas engarrafadas, como o vinho, visto poder permanecer guardado nessa forma durante bastantes anos. A produção de fitofármacos também contribui para o aumento acentuado dos níveis ambientais de vanádio em determinadas regiões do globo terrestre, tornando-o um poluente. Desse modo, a detecção de alterações em actividade enzimática induzidas por este elemento, assume actualmente particular importância. As interferências que este metal de transição pode exercer nos seres vivos pode ser ilustrada recorrendo à cultura de leveduras, organismos eucariotas unicelulares, excelentes para treinar estudantes em actividades de química, ambiente e vida.

A utilização de ferramentas bioinformáticas permite detectar no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* sequências homólogas de sequências do genoma humano. Tal facto torna possível utilizar estes eucariotas unicelulares como modelo biológico, alternativo aos pequenos animais, como cobaias, desenvolvendo-se linhas de investigação que avaliam o *stress* por metais sobre os seres vivos, incluindo o Homem. Além do mais, a levedura em questão é um organismo GRAS, pelo que protocolos desenvolvidos com esta levedura são adequados ao desenvolvimento de conhecimentos e competências em alunos dos ensinos básico e secundário.

O desenvolvimento da actividade de investigação aqui apresentada possibilitou aos alunos de uma turma-piloto da disciplina de Física e Química A (ano I), do 10º ano de escolaridade, da Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal, participarem activamente no planeamento e na preparação de uma actividade laboratorial, com o objectivo de avaliar como o vanádio afecta o crescimento da levedura vínica *S. cerevisiae*. Os resultados experimentais obtidos em cada fase desta actividade de investigação mobilizaram os estudantes para uma aproximação científica importante a estudos ambientais que utilizem microrganismos como peças importantes do processo. A avaliação de competências desenvolvidas pelos alunos, perante um mesmo conjunto de questões problema colocadas antes e após a realização das diferentes fases da actividade experimental, permitiu avaliar o seu grau de cumprimento.

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

Investigar a acção do metavanadato de amónio, um sal pentavalente de vanádio, como agente metálico de *stress* no crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃.

Contextualizar a influência do vanádio sobre sistemas vivos, ao desenvolvimento de competências no âmbito das ciências experimentais para o ensino secundário.

2.2. Objectivos específicos

Conhecer:

- as propriedades físico-químicas do vanádio.
- as propriedades físico-químicas do metavanadato de amónio.
- a actividade biológica do vanádio.
- caracterização biológica de *S. cerevisiae*.
- o enunciado da lei de Beer – Lambert.

Compreender:

- a localização do vanádio na tabela periódica.
- os estados de oxidação que o vanádio pode assumir.
- o estado de oxidação do vanádio no metavanadato de amónio.
- a reactividade do metavanadato de amónio.
- a importância dos metais de transição nos sistemas vivos.
- a toxicidade do metavanadato de amónio nos sistemas vivos.
- a importância da *S. cerevisiae* nos estudos de toxicidade pelos metais.
- o significado matemático e físico-químico da lei de Beer – Lambert.
- a importância de um branco em espectrometria de absorção molecular.

Dar valor:

- ao estado de oxidação pentavalente do vanádio
- à toxicidade do vanádio pentavalente.
- à resposta ao metavanadato de amónio por *S. cerevisiae* UE-ME₃.
- à preparação de soluções tampão para o estudo de enzimas.
- ao intervalo de concentração em que é válida a lei de Beer – Lambert.
- à qualidade de uma curva de calibração.

- à preparação de um branco em espectrometria de absorção molecular.
- à detecção de erros acidentais na validação dos resultados obtidos.
- à curva de reacção obtida por espectrometria de absorção molecular.
- ao crescimento da *S. cerevisiae* na presença de metavanadato de amónio.
- à actividade fosfatase alcalina (ALP) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em presença de metavanadato de amónio.

Aplicar:

- a lei de Beer - Lambert à quantificação de outros compostos.
- a espectrometria de absorção molecular à detecção de outras actividades enzimáticas.
- a metodologia na avaliação da acção de outros metais.
- as alterações do crescimento e dos níveis de fosfatase alcalina (ALP) em *S. cerevisiae* UE-ME₃, na detecção de vanádio no ambiente.

2.2. Objectivos funcionais

Seleccionar material adequado à preparação de soluções.

Preparar soluções tampão e outras.

Preparar colóides.

Obter suspensões.

Preparar meios de cultura líquidos e sólidos para crescimento de leveduras.

Utilizar ultra-sons na lise celular.

Obter extractos e fracções celulares por centrifugação.

Construir curva de calibração (A vs [BSA]) para quantificação de proteínas.

Construir curva de reacção (A vs t) para determinar a actividade enzimática ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃, utilizando como substrato o para-nitrofenilfosfato (p-NPP).

3. Competências gerais a desenvolver

Tipo processual:

- seleccionar material de laboratório adequado à actividade experimental;
- identificar material e equipamento de laboratório e explicar a sua utilização / função;
- manipular com correcção e respeito por normas de segurança, material e equipamento;
- executar, com correcção, técnicas previamente ilustradas ou demonstradas.

Tipo conceptual:

- discutir os limites de validade dos resultados obtidos respeitantes ao observador, aos instrumentos e à técnica usados;
- interpretar simbologia de uso corrente em Laboratórios de Química (regras de segurança de pessoas e instalações, armazenamento, manipulação e eliminação de resíduos químicos e biológicos);
- identificar parâmetros que poderão afectar um dado fenómeno e planificar modos de os controlar;
- formular uma hipótese sobre o efeito de um determinado parâmetro;
- planear uma experiência para dar resposta a uma questão – problema.

Tipo social, atitudinal e axiológico:

- apresentar e discutir na turma propostas de trabalho e resultados obtidos;
- desenvolver o respeito pelo cumprimento de normas de segurança: gerais, de protecção pessoal e do ambiente.

Aprendizagem:

- usar diferentes estratégias de aprendizagem e modos de construção de conhecimento científico.

Sociais:

- cooperar em equipa de forma a recolher dados, executar procedimentos ou interpretar informação científica.

Processuais:

- observar, experimentar, avaliar, interpretar gráficos, mobilizar destrezas matemáticas;
- analisar criticamente situações particulares.

Comunicativas:

- usar e compreender linguagem científica, registar, ler e argumentar usando informação científica.

4. Metodologia

Os conteúdos não podem ser tratados à margem dos seus processos de construção. Desse modo, o professor deve contribuir para a construção de uma aprendizagem significativa, que segundo Novak (1993), está subjacente à integração construtiva do pensamento, sentimento e acção que ocorre na aprendizagem humana e na construção de novos conhecimentos (Alonso, 2000). Elliot (1995) complementa ainda referindo que para fomentar o pensamento independente e o aumento da compreensão e da reflexão ou metacognição, os professores devem também reestruturar a sua visão do saber e a maneira de o representar perante os alunos.

Pretendeu-se desse modo desenvolver e avaliar uma metodologia que permitisse a construção de novos conhecimentos a partir dos anteriores, recorrendo-se ao que Vigotsky (1988) denomina por zona de desenvolvimento potencial. Proporcionou-se com os intervenientes, o que Magalhães (2006) refere como uma educação mais global e menos fragmentada, possibilitando melhorar a atitude e o interesse dos alunos em relação à ciência e à sua efectiva aprendizagem, mostrando uma imagem mais completa e contextualizada, preparando-os simultaneamente para o exercício de uma cidadania responsável.

No cumprimento da metodologia utilizada, pretendeu-se que o trabalho experimental realizado no decurso desta actividade viesse dar resposta a um problema onde os alunos aplicassem e desenvolvessem novas competências (Gómez 2007, Gott, 1995).

Desse modo, para proporcionar uma contextualização de alguns objectos de ensino no âmbito das ciências experimentais, tomando uma abordagem CTS – A (Ciência – Tecnologia – Sociedade - Ambiente), a concretização dos objectivos traçados para este trabalho obedeceu a um plano que desse resposta à questão problema: Como o vanádio afecta o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*?”.

Contudo, proporcionou-se previamente uma discussão com os alunos sobre a problemática do vanádio como metal de transição que em algumas regiões está-se a acumular nos solos e na água devido à actividade humana. Perguntando aos alunos se este fenómeno pode provocar problemas na saúde pública, estes foram orientados para a formulação da questão problema supra citada e simultaneamente sensibilizados para a importância de utilizarem um organismo nativo, eucariota, de baixa toxicidade e sem levantar problemas éticos associados à utilização de animais como cobaias.

De acordo com Pella (1961), esta abordagem permite uma aproximação à categoria I classificada pelo autor, na qual o trabalho experimental baseado na resolução de

problemas, tem a intervenção activa dos alunos em todas as fases de procedimento relativas à formulação do problema, nomeadamente, a formulação de hipóteses, planificação, realização, registo de dados e de observações, conclusões.

A metodologia desenvolvida e avaliada, esteve ainda de acordo com o modelo de resolução de problemas em actividades de natureza investigativa referenciado por Kempa (1986), segundo o qual, existe genericamente como sequência de etapas, o reconhecimento de problemas, transformação de um problema numa investigação aberta, desenho e planeamento do trabalho experimental, sua execução prática, registo de dados e observações, interpretação de dados e informações, avaliação de resultados e métodos, e por fim, a solução do problema (Araújo, 2008).

De referir ainda que os alunos foram inicialmente sensibilizados para a importância de darem resposta a essa questão, tendo em conta que as homologias sequenciais que o genoma dessa levedura apresenta com o genoma humano, pode permitir obter hipóteses acerca dos possíveis efeitos do vanádio na saúde pública, visto que este elemento já se assume como poluente devido à intervenção do homem. Foi ainda importante informar os alunos que o recurso a esta levedura, que se obtém facilmente e que não apresenta toxicidade relevante, evita que se utilizem cobaias, o que é também uma enorme vantagem por motivos éticos e respeito pelos animais. Vai-se assim ao encontro de que o recurso a problemas actuais e relevantes, suscita o interesse e a participação activa dos alunos no desenvolvimento de competências, na construção de conhecimentos científicos, na compreensão do papel da ciência e da tecnologia na sociedade, assim como no desenvolvimento cognitivo, social, político, moral e ético dos alunos (Reis, 2008; Sadler, 2004; Zeidler, 2003).

Os alunos foram estimulados a discutir e planificar em grupo as actividades experimentais, de modo a darem resposta às várias questões problema. Antes de terem desenvolvido cada uma das actividades experimentais, responderam a um conjunto de questões que permitiram avaliar competências gerais e específicas definidas no âmbito das ciências experimentais e que se encontram descritas detalhadamente neste trabalho. Após a realização de cada uma dessas actividades experimentais, os alunos voltaram a responder às mesmas questões, de modo a proceder-se à avaliação da evolução de competências, a partir da comparação de médias referentes ao grau de desempenho obtido antes e após a realização das referidas actividades. Foi utilizado um grau de confiança de 95%.

Por fim, pretendeu-se ainda desenvolver nos alunos envolvidos alguns juízos de valor que se encontram no nível superior do domínio metodológico do V. de Gowin, os quais visam criar uma importância e um conjunto de valores relacionados com o

conhecimento produzido (Moreira, 1997; Gowin, 1981). Este nível pode ter sido atingido ao ter-se promovido uma discussão com os intervenientes no trabalho experimental, na qual, perante uma análise cuidada dos resultados obtidos, colocou-se como hipótese o vanádio causar problemas na saúde pública e daí, a necessidade de se desenvolverem comportamentos que visem diminuir a emissão desse elemento para o meio ambiente.

4.1. Estratégias

4.1.1. Estratégia experimental

A concretização dos objectivos definidos para este trabalho obedeceu ao plano:

Locais de realização:

- Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III do Colégio Luís António Verney, Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora.
- Laboratório de Química da Escola Secundária Dom Manuel Martins, Setúbal.

Duração: 12 meses.

Modelo Biológico: *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃.

Colecção: estirpe isolada em vinhos regionais do Alentejo depositada na colecção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora.

Composto testado: metavanadato de amónio (NH₄VO₃).

Preparações prévias:

Meio líquido YPD;

Meio sólido YPD e YPD-V com concentrações diferentes de NH₄VO₃;

Cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio líquido até à fase exponencial média;

Cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meios sólidos YPD e YPD-V.

Tratamentos: leveduras crescidas em meio sólido durante 72 h a 28 °C

- I sem exposição ao metavanadato de amónio, no meio YPD
- II exposição ao metavanadato de amónio, 25 mM, no meio YPD-V
- III exposição ao metavanadato de amónio, 75 mM, no meio YPD-V

Resultados obtidos ao longo da cultura:

- acompanhamento da cultura em meio líquido pela turbidez a 640 nm.

Resultados obtidos no final da cultura:

- observação qualitativa da densidade celular nos diferentes meios sólidos de crescimento das leveduras.

Fracção sub-celular seleccionada:

- sobrenadante obtido após centrifugação a 12000 g, durante 15 min (Sob).

Parâmetros analisados:

- curva de crescimento;
- conteúdo em proteína no sobrenadante pós-12000 g;
- actividade enzimática ALP no sobrenadante pós-12000 g.

Técnicas utilizadas:

- pesagem, balança analítica;
- leitura de turbidez, espectrómetro de absorção molecular;
- desintegração celular, homogeneizador de sonda de ultra - sons;
- fraccionamento celular, super-centrífuga;
- quantificação de proteínas, espectrómetro de absorção molecular;
- quantificação de enzimas, espectrómetro de absorção molecular.

4.1.2. Estratégia pedagógica

Estabelecimento de ensino: Escola Secundária Dom Manuel Martins, Setúbal.

Universo:

22 alunos que frequentam a disciplina de Física e Química A (ano I), os quais procederam à preparação dos meios de cultura; acompanharam o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em meios com diferentes concentrações de metavanadato de amónio; procederam à desintegração celular, fraccionamento celular e determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry.

4 alunos que frequentam a Área de Projecto (12º ano) e concluíram a disciplina de Física e Química A (ano II) no ano lectivo anterior, os quais procederam à monitorização por espectrometria de absorção molecular, da reacção da fosfatase alcalina utilizando o para-nitrofenilfosfato (p-NPP) como substrato.

Distribuição etária: 15 (11 %) - 22 (4 %) anos.

Tema: Metais, ambiente e vida.

Enquadramento:

Unidade temática II - Na atmosfera da Terra: radiação, matéria e estrutura (no âmbito do programa de Física e Química A – ano I);

Unidade temática I - Metais e Ligas Metálicas (no âmbito do programa de Química – 12º ano);

Área de Projecto do 12º ano.

Abordagem Pedagógica:

Estabelecimento dos critérios de avaliação de competências.

Avaliação de competências específicas pré - actividade experimental.

Desenvolvimento da actividade experimental subdividida em dois momentos:

- exposição teórica e planificação acompanhada da actividade experimental.
- desenvolvimento da actividade experimental em 6 fases de abordagem:
 - (a) preparação do meio YPD líquido e dos meios sólidos YPD e YPD-V;
 - (b) inoculação do meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez;
 - (c) inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h;
 - (d) extracção do enzima ALP de leveduras crescidas nos diferentes meios sólidos;
 - (e) determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry;
 - (f) determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP).

Tratamento e discussão dos resultados experimentais.

Resolução de questionários pós - actividade experimental.

Avaliação de competências específicas desenvolvidas durante a actividade experimental.

Avaliação do grau de satisfação dos alunos relativamente à actividade experimental.

4.2. Procedimento experimental

O principal alvo deste trabalho foi aproximar jovens estudantes à problemática dos metais ambiente e vida e explorar os efeitos do vanádio, um metal de transição, sobre os seres vivos, planificando e desenvolvendo actividades experimentais que envolveram a cultura de *S. cerevisiae*, o acompanhamento do seu crescimento, a recolha das células e obtenção do sobrenadante pós-12000 g para a quantificação da proteína, bem como, para a determinação da actividade enzimática fosfatase alcalina, como forma de ilustrar a resposta de um ser vivo à presença de vanádio, um caso particular de metal de transição (Domingos, 1987).

Em termos de estratégia laboratorial, o cumprimento dos objectivos definidos para este trabalho obedeceu ao plano que passaremos a descrever.

A acção decorreu no Laboratório de Química da Escola Secundária Dom Manuel Martins em Setúbal e no Laboratório de Bioquímica Analítica, fase III, do Departamento de Química, da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, em Évora. O modelo biológico utilizado foi a *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, estirpe nativa, isolada do mosto de vinhos regionais do Alentejo e depositada na colecção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora. O agente químico utilizado foi o metavanadato de amónio (NH₄VO₃). Os ensaios envolveram a preparação de meios de cultura YPD e YPD-V utilizados no crescimento de leveduras, na monitorização da respectiva curva de crescimento, na determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos (controlo e 25, 75 mM de NH₄VO₃) em culturas desenvolvidas durante 72 h, a 28 °C. Os resultados obtidos ao longo dos ensaios resultaram da observação visual dos meios de cultura, do acompanhamento do crescimento celular por leituras da turbidez a 640 nm, da determinação qualitativa da densidade celular em placa, da determinação quantitativa da concentração de proteínas e de actividade enzimática nos sobrenadantes pós-12000 g, relativo aos diferentes tratamentos que se encontravam correlacionados com as características dos meios YPD e YPD-V.

As técnicas utilizadas envolveram a pesagem em balança analítica de reagentes, a medição de volumes, recorrendo ao balão volumétrico, a provetas, a pipetas e micropipetas, a esterilização de materiais e de meios de cultura pelo calor húmido em autoclave, pelo calor seco em estufa, ou por filtração, bem como, a determinação da turbidez do meio, da concentração de proteína e da actividade fosfatase alcalina por espectrometria de absorção molecular. Na preparação de algumas soluções como as que continham metavanadato de amónio os alunos utilizaram material protector apesar da pequena quantidade envolvida.

Em termos pedagógicos, o cumprimento dos objectivos definidos para este trabalho obedeceu ao plano que teve em conta o universo de alunos envolvidos no processo, correspondente a uma turma-piloto com 22 membros, a frequentarem a disciplina de Física e Química A (ano I), do 10º ano de escolaridade, bem como, outra turma-piloto com 4 membros que frequentaram a disciplina de Área de Projecto e concluíram a disciplina de Física e Química A (ano II) no ano lectivo anterior, na Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal. A distribuição etária dos participantes localizava-se entre os 15 (11 %) e os 22 (4 %) anos de idade, com o máximo etário gaussiano, localizado em torno dos 16 anos (52%). Os alunos participantes foram integrados nas diferentes fases da actividade experimental que decorreram durante o 3º período do ano lectivo 2008/2009.

4.2.1. Trabalho desenvolvido pelo mestrando

4.2.1.1. Cuidados de assepsia em microbiologia

O material necessário que poderia estar em contacto com a cultura de leveduras durante o seu crescimento foi previamente esterilizado e manipulado de acordo com os cuidados de assepsia, uma vez que é essencial manter as culturas puras, evitando qualquer tipo de contaminação (Atlas, 1997; Madigan, 1997). Utilizaram-se três metodologias de esterilização de material, soluções e ambiente de trabalho.

O equipamento mais utilizado para esterilizar materiais e meios de cultura em meio húmido foi a autoclave, cujo modo de funcionamento é semelhante ao das panelas de pressão domésticas. Operam normalmente sob uma pressão de 1,02 bar e à temperatura de 121 °C. A autoclave esterilizou a maioria dos materiais durante 15 a 30 min, tendo sido a variação do tempo de esterilização devida à relação superfície/volume dos materiais a esterilizar. A pressão, nos valores utilizados em autoclave, por si só não exerceu qualquer efeito na esterilização, sendo útil para elevar a temperatura do vapor acima dos 100 °C. O tempo em que decorreu o processo foi necessário para garantir que o vapor penetrasse e aquecesse os materiais alvo da esterilização. Como o ar relativamente frio da câmara de esterilização é muito mais denso do que o vapor de água à temperatura de esterilização, causa uma estratificação na autoclave que conduz a uma falta de uniformização da temperatura desenvolvida se não for permitida a saída do ar. Considerando que o ar e o vapor misturam-se lentamente, as diferenças de temperatura entre camadas pode ser muito grande, por isso tornou-se necessário substituir todo o ar por vapor, recorrendo ao procedimento designado por purga. Os materiais mais volumosos requereram um maior tempo de esterilização. No caso em que foi necessário utilizar frascos com tampa roscada, estas foram pouco apertadas para a autoclave de

modo a permitirem a saída do ar e entrada do vapor, evitando-se assim o seu rebentamento (Ferreira, 1998; Atlas, 1997; Madigan, 1997).

O calor seco foi utilizado para esterilizar material de vidro e outros materiais sólidos termo-estáveis. Trata-se também de um dos métodos de esterilização mais utilizados e de fácil aplicação. O equipamento indispensável é apenas uma estufa de elevada temperatura (160–200 °C) com circulação de ar. Para além de ser tida em conta a resistência térmica dos materiais a esterilizar por esta técnica, outra precaução considerada prendeu-se com a minimização da possibilidade de contaminar esses materiais após a esterilização, facto que nos obrigou a envolver os materiais em papel de alumínio, papel Craft e mesmo folha dupla de papel de lista telefónica. O calor seco tendo como fonte o bico de Bunsen foi ainda utilizado para esterilizar a atmosfera de trabalho quando se manuseia material, soluções esterilizadas e culturas de microrganismos (Ferreira, 1998).

O principal método utilizado para a esterilização de líquidos que contenham componentes termo-sensíveis foi a filtração. Existem actualmente disponíveis no mercado filtros esterilizantes de vários poros e capacidades filtrantes. Os que utilizamos foram os filtros com poros de 0,2 µm de diâmetro, que retêm os microrganismos presentes nas soluções, nomeadamente de glucose. Esta técnica requereu a recolha do filtrado em condições de assepsia para impedir a contaminação do líquido esterilizado (Prescott, 2002; Madigan, 1997).

4.2.1.2. *Material Biológico*

O material biológico utilizado neste trabalho foi a levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, isolada de mostos de vinhos regionais do Alentejo e depositada na colecção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora.

4.2.1.3. *Meios de cultura*

O meio YPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) resultou da preparação de uma solução de extracto de levedura (1%) e peptona (2%) em água bidestilada que foi esterilizado pelo calor húmido. Posteriormente adicionou-se glucose (2%) esterilizada por filtração (filtro 0,2 µm). A preparação de meio sólido incluiu a adição de agar (2%).

O meio YPD-V sólido foi preparado pela adição de metavanadato de amónio ao meio YPD com agar, de forma a obter a concentração de 25 mM ou 75 mM de NH₄VO₃.

4.2.1.4. Acompanhamento do crescimento da cultura

A levedura, mantida no laboratório de Bioquímica Analítica da Universidade de Évora, a -80 °C em presença de glicerol, foi inoculada em erlenmeyer contendo 20,0 mL de meio e deixada crescer *overnight* a 28 °C, com agitação constante (150 rpm). Após esse período de tempo pipetou-se 3,0 mL dessa cultura que foram utilizados para inocular 100 mL de meio YPD líquido. O crescimento da levedura foi acompanhado durante 20 h por leitura da turbidez a 640 nm em intervalos de 1h.

4.2.1.5. Exposição ao metavanadato de amónio

As células correspondentes a uma colónia conservada a -80 °C foram cultivadas em 20 mL de meio YPD líquido e crescidas *overnight*, a 28 °C com agitação orbital constante de 150 rpm. Com esta cultura fresca, inoculou-se meio YPD e acompanhou-se o crescimento da cultura lendo a turbidez a 640 nm, até atingir 0,8 (fase exponencial média). Utilizou-se 0,3 mL/placa (\varnothing 9,5 cm) desta cultura para inocular meio sólido YPD e meio YPD-V sólido previamente preparado como descrito na secção 4.2.1.3., deixando crescer a 28 °C em incubadora durante 72 h.

4.2.1.6. Obtenção dos lisados celulares

A obtenção do lisados celulares obrigou à preparação prévia de tampão fosfato 10 mM pH = 7,0, dissolvendo 0,2134 g de NaH_2PO_4 em 100 mL de H_2O bidestilada, bem como 0,1354 g de Na_2HPO_4 em 100 mL de H_2O . Em seguida misturaram-se as duas soluções e acertou-se o pH a 7,0 com HCl 1 M, recorrendo a um potenciómetro. Acertou-se o volume da solução em balão volumétrico de 250 mL.

As células de levedura crescidas durante 72 h foram recolhidas, lavadas com água bidestilada, recorrendo a centrifugação, ressuspensas em 10 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e posteriormente lisadas em homogeneizador de ultra-sons durante 3 x 5 min (0,1; 1).

4.2.1.7. Obtenção do sobrenadante pós-12000 g

Os lisados obtidos como descrito na secção 4.2.1.6. foram submetidos a centrifugação diferencial 3000 g, 10 min, e posteriormente 12000 g, 20 min. Alíquotas dos sobrenadantes foram guardadas à temperatura de -20 °C para posterior utilização na determinação da concentração de proteínas e da actividade enzimática fosfatase alcalina (Lake, 1987; Sugimoto, 1990).

4.2.1.8. Determinação do conteúdo em proteínas

A determinação do conteúdo em proteínas do sobrenadante pós-12000 g, foi realizada de acordo com o método de Lowry (1951). Este método quantifica resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano presentes nas proteínas que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, em presença de iões Cu^{2+} em meio alcalino gerando como produto final um complexo de heteromolibdénio que apresenta cor azul intensa. Procedeu-se à construção de uma curva de calibração (0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig 5.2), utilizando uma solução-mãe de BSA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como padrão.

Preparou-se o reagente de Lowry composto por sulfato de cobre (II) pentahidratado 0,1 % (p/v) e tartarato de sódio e potássio 0,2 % (p/v) em carbonato de sódio a 2 % (p/v). Procedeu-se também à preparação do reagente de Folin-Ciocalteu, por diluição 1/2 da solução comercial com água bidestilada. Adicionou-se a 0,250 mL de cada solução-padrão ou das amostras diluídas em NaOH 0,5 M (sobrenadante pós-12000 g) 1,25 mL de reagente de Lowry preparado extemporaneamente. Agitou-se no vórtex e após 10 min adicionou-se 0,125 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, voltando a agitar. Após 30 min leu-se a absorvência a 720 nm. Interpolou-se, na curva de calibração previamente construída, os valores de absorvência obtidos para determinarmos o concentração de proteínas.

4.2.1.9. Determinação da actividade fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma metalo-enzima com Zn e Mg no seu centro activo que em meio alcalino hidrolisa ligações fosfo-ésteres. Sob o ponto de vista estrutural é uma glicoproteína. Está presente em quase todos os organismos vivos, com excepção de algumas plantas. Em leveduras o produto da expressão do gene PHO8 localiza-se no tonoplasto, ao qual está ancorado pela região glucídica. A actividade ALP foi detectada em cada extracto, quantificando em contínuo, por espectrometria de absorção molecular, durante 180 s, o produto da reacção:

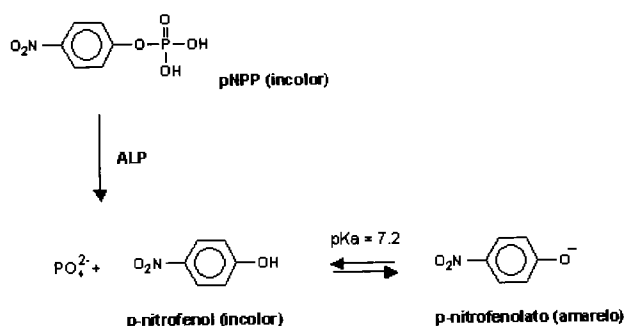


Figura 4.1. Reacção da fosfatase alcalina com o substrato sintético p-NPP.

A actividade enzimática foi calculada a partir do coeficiente angular de curvas de reacção traçadas em células de absorção molecular, a 405 nm, em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,5, utilizando como substrato o para-nitrofenilfosfato (0,9994.>r> 0,9997).

A determinação da actividade ALP obrigou à preparação prévia de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH = 8,5, dissolvendo-se 6,0570 g de Tris base em 25 mL de H₂O bidestilada, titulando-se esta solução com HCl 1M até pH 8,5. Acertou-se o volume final em balão volumétrico de 100 mL.

4.2.2. Trabalho desenvolvido com os alunos

Após a definição dos objectivos gerais do trabalho, os alunos, organizados em pequenos grupos de 2 ou 3 elementos, desenvolveram diferentes actividades por etapas, procedendo em cada uma delas à sua planificação, tendo também havido especial preocupação para que concluíssem por si mesmos os procedimentos e cálculos necessários à sua realização.

Apresenta-se em anexo os principais elementos decorrentes desse trabalho, nomeadamente, diapositivos em *PowerPoint* expostos aos alunos, orientações escritas para desenvolvimento da metodologia experimental, tendo em vista a planificação de cada uma das actividades, assim como, um conjunto de questões pós-laboratoriais para cada fase do procedimento experimental. Relativamente a cada etapa, mostra-se na secção 5 algumas das evidências e resultados obtidos.

4.2.2.1. Preparação do meio YPD líquido, e dos meios sólidos YPD e YPD-V

Planeamento da preparação de meios de cultura para S. cerevisiae UE-ME₃

A escolha do meio de cultura YPD a preparar por cada um dos grupos foi planeada com a primeira turma-piloto, tomando como exemplo a composição dos ensaios controlo. Preencheu-se desse modo a tabela com a seguinte estrutura:

Meio de cultura	Grupo
20 mL de meio de cultura YPD líquido.	
100 mL de meio de cultura YPD líquido.	
100 mL de meio de cultura YPD sólido sem metavanadato de amónio.	
100 mL de meio de cultura YPD sólido com a menor concentração de metavanadato de amónio, planeado pela turma (____ mM).	
100 mL meio de cultura YPD sólido com a concentração mais elevada de metavanadato de amónio, planeado pela turma (____ mM).	

Preparação dos meios líquidos YPD

Num erlenmeyer de 100 mL, dissolveu-se 0,2000 g de extracto de levedura, 0,4000 g de peptona e 0,4000 g de glucose em 20 mL de água bidestilada.

Num erlenmeyer de 250 mL, dissolveu-se extracto de levedura, peptona, glucose em água, de modo a preparar-se 100 mL de meio de cultura semelhante ao anterior. Desse modo, os alunos discutiram, calcularam e mediram:

- massa de extracto de levedura
- massa de peptona
- massa de glucose
- volume de água

Nota: Estas duas culturas foram preparadas separadamente a partir de dois grupos de trabalho, que trocaram informações entre si.

Preparação de meios sólidos YPD e YPD-V

Para o ensaio controlo, sem metavanadato de amónio, dissolveu-se em frasco graduado, 2,0000 g de extracto de levedura, 4,0000 g de peptona, 4,0000 g de glucose, 4,0000 g de agar com 200 mL de água bidestilada.

Para o ensaio em presença de metavanadato de amónio prepararam-se 200 mL de dois meios sólidos YPD-V com concentração de 25 e 75 mM de NH_4VO_3 , tendo os alunos discutido, calculado e medido:

- concentração molar de metavanadato de amónio pretendida;
- quantidade de metavanadato de amónio necessária para cada meio de cultura;
- massa molar do metavanadato de amónio (NH_4VO_3);
- massa necessária de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) para preparar cada meio de cultura;
- massa a medir tendo em conta a balança apresentada.

4.2.2.2. Inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez

Após a preparação dos meios de cultura YPD e a sua esterilização em autoclave durante 120 min inoculou-se uma alíquota de cultura isolada de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ em 20 mL de meio líquido YPD recorrendo a uma ansa de crómio – níquel, previamente esterilizada colocando-se de imediato em banho com temperatura controlada por termostato, no qual permaneceu durante 16 h à temperatura de 28 °C.

Pipetou-se 3 mL da suspensão obtida para 100 mL de meio líquido YPD, colocando-se a nova suspensão em banho com temperatura controlada por termostato à temperatura de 28 °C, monitorizando-se a turbidez da cultura até atingir 0,8.

4.2.2.3. Inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h

O meio YPD sólido foi distribuído em caixas de Petri previamente esterilizadas. Após a sua completa solidificação, mais de 12 h, estes meios foram inoculados, à chama, com *S. cerevisiae*, utilizando 0,300 mL de cultura líquida a meio da fase exponencial de crescimento, turbidez_{640nm} 0,8.

Repetiu-se o mesmo procedimento com os meios YPD-V sólidos, preparados com diferentes concentrações de metavanadato de amónio.

4.2.2.4. Extração do enzima ALP de leveduras crescidas nos diferentes meios sólidos

Ao fim de 72 h de crescimento, as células de levedura foram recolhidas, lavadas e ressuspensas em 5,0 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0, sendo posteriormente lisadas em homogeneizador de ultra-sons durante 3x 5 min (0,1; 1).

Os homogeneizados foram submetidos a centrifugação diferencial 3000 g, 10 min, e posteriormente 12000 g, 20 min. Alíquotas dos sobrenadantes foram guardadas a -20 °C para posterior utilização na determinação de conteúdo proteico e actividade enzimática ALP.

4.2.2.5. Determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry

Preparação do reagente de Lowry

Mediu-se e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL, 0,5 mL de solução B (Sulfato de cobre pentahidratado) e 0,5 mL da solução C (Tartarato de sódio e potássio 2 % (p/V)). Completou-se o volume do balão com solução A (Carbonato de sódio a 2 % (p/V) em hidróxido de sódio 0,1 M).

Preparação do reagente de Folin

Discutiu-se com os alunos o volume de solução de Folin-Ciocalteu (Solução D – Método de Lowry) necessário para preparar 10,0 mL do reagente de Folin, diluindo ½ a referida solução. Preparou-se a diluição e agitou-se no vórtex vigorosamente.

Preparação das soluções de albumina de soro bovino (BSA)

Em cada tubo de ensaio, diluiu-se a solução de BSA inicial com a solução aquosa de hidróxido de sódio, de modo a obter-se 1,0 mL de novas soluções de BSA com a concentração mássica indicada no quadro seguinte:

Tubo	Concentração mássica de BSA µg/mL
1	0
2	50
3	75
4	100
5	125
6	150
7	175
8	200

Calculou-se e registou-se o volume de BSA e de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M necessários para se preparar as várias soluções de diferente concentração mássica de BSA, tendo preenchido o quadro seguinte:

Tubo	Concentração mássica de BSA (µg/mL)	Volume de BSA / mL (500 µg/mL)	Volume de NaOH / mL (0,5 M)
1	0		
2	50		
3	75		
4	100		
5	125		
6	150		
7	175		
8	200		

Agitou-se cada mistura no vórtex durante duas vezes e deixou-se 10 min. em repouso.

Adicionou-se 0,50 mL de reagente de Folin a cada mistura e aguardou-se 30 min.

Discutiu-se e registou-se o comprimento de onda a utilizar adequadamente, tendo em conta as informações disponibilizadas.

Mediu-se a absorvência de cada amostra a 720 nm.

Construiu-se em folha de Excel a curva de calibração e calculou-se a recta de regressão recorrendo ao método dos mínimos quadrados. Discutiu-se a qualidade da curva obtida tendo em conta o coeficiente de correlação e a obediência à lei de Beer-Lambert, em particular ao valor da ordenada na origem. Posteriormente, os alunos

calcularam a concentração total de proteína em cada extracto por interpolação gráfica da curva de calibração e tendo em conta as diluições efectuadas. Representou-se graficamente em folha Excel o valor da concentração total de proteína para cada situação experimental. Discutiu-se como a concentração de metavanadato de amónio no meio de cultura da levedura em estudo, pode afectar a concentração total de proteína em cada extracto.

4.2.2.6. *Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP)*

Discutiu-se e seleccionou-se o comprimento de onda óptimo (405 nm) para monitorizar no espectrómetro de absorção molecular, a 37°C, durante 180 s, a variação de absorvência devido à libertação de p-nitrofenolato para o meio de reacção.

Preparou-se o branco, misturando-se:

- 100 µL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,5;
- 200 µL de p-nitrofenilfosfato 6 mM;
- 700 µL de água destilada.

Discutiu-se a forma de preparar a mistura de reacção. Preparou-se para cada situação experimental a mistura:

- 100 µL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,5;
- 200 µL de p-nitrofenilfosfato 6 mM;
- 600 µL de água destilada;
- 100 µL de extracto.

Após a adição do extracto monitorizou-se de imediato a absorvência ao longo do tempo.

Construiu-se a curva de reacção para cada extracto recorrendo a folha de Excel. Optimizou-se a diluição adequada dos extractos confirmando a linearidade das curvas de reacção pelo método dos mínimos quadrados. Calculou-se a velocidade inicial de reacção (v_0) para a ALP a partir do coeficiente angular das curvas de reacção. Calculou-se a actividade específica ALP pela razão v_0 (min^{-1})/[proteína] (mg/mL). Representou-se graficamente em folha Excel o valor da actividade específica para cada situação experimental. Discutiu-se como a concentração de metavanadato de amónio no meio de cultura da levedura em estudo, pode afectar a concentração da fosfatase alcalina.



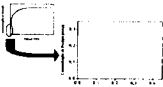

4.2.3. Análise estatística das competências desenvolvidas pelos alunos e grau de satisfação

A avaliação de competências específicas desenvolvidas pelos alunos durante a acção, foi determinada recorrendo a um mesmo conjunto de perguntas problema colocadas antes e após a realização das seis fases da actividade experimental.

A análise estatística dos resultados obtidos antes e após a acção, expressos pela pontuação obtida em cada pergunta (0-100), tomou como significativas as diferenças detectadas entre cada instante de avaliação, recorrendo ao teste t-student para amostras independentes. Uma análise mais pormenorizada dos resultados experimentais foi aplicada à pontuação obtida em cada uma das seis fases da actividade experimental (a, b, c, d, e, f) pela ANOVA.I. Recorreu-se ao *Software* SPSS (v 18; SPSS Inc, Chicago, IL), licenciado para a Universidade de Évora (Sokhal, 1997).

A avaliação do grau de satisfação pessoal dos alunos relativa à actividade experimental realizou-se com recurso a um inquérito de opinião. Os resultados foram analisados pelo valor percentual de respostas obtidas em cada item.

4.3. Organigrama

Mestrando	Alunos
<p>Elaboração de questionários que permitam a avaliação de competências gerais no âmbito das ciências experimentais.</p> <p>↓</p> <p>Definição dos critérios de correcção das questões apresentadas nos questionários.</p> <p>↻ Cuidados de assepsia via seca e via húmida.</p> <p>Preparação de meio YPD líquido meio YPD sólido e meios YPD-V sólidos (25 mM e 75 mM)</p>  <p>↓</p> <p>Inoculação de levedura vinda de -80 °C em 20 mL de meio líquido YPD e crescimento 16 h a 28 °C.</p> <p>↻ Inoculação de 3 mL do meio obtido em 100 mL de meio líquido YPD e registo da turbidez_{640 nm} da cultura durante 20 h.</p> <p>↓</p> <p>Adição de 0,3 mL do meio de cultura na fase exponencial média de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> a meio YPD sólido e a diferentes meios YPD-V sólido (25 mM e 75 mM NH₄VO₃), com três réplicas para cada um dos meios.</p> <p>↻</p> <p>Crescimento em incubadora a 28 °C durante 72 h.</p>  <p>↻ Obtenção dos lisados celulares (recolha das células e lavagem com água bidestilada; resuspensão em tampão fosfato 0,1 M, pH 7; lise com homogeneizador de ultra-sons 3 vezes 5 min (0,1 ; 1)).</p> <p>↓</p> <p>Armazenamento a -20°C de alíquotas sobrenadante pós-12000 g.</p> <p>↻ Determinação da concentração de proteínas no sobrenadante pós-12000 g pelo método de Lowry.</p> <p>↓</p> <p>Obtenção de curvas de reacção a 405 nm utilizando o p-NPP como substrato. Determinação da actividade enzimática e da actividade específica da ALP para cada situação experimental.</p>  <p>↻</p> <p>Tratamento estatístico que permita a comparação de médias da avaliação das respostas dadas pelos alunos às questões por estes respondidas antes e após a realização da actividade experimental.</p> <p>↻</p> <p>Avaliação do grau de satisfação dos alunos pela realização da actividade experimental.</p>	<p>Recolha de informação sobre a presença de vanádio no meio ambiente resultante da acção humana.</p> <p>↻</p> <p>Discussão das possíveis interferências do vanádio na vida.</p> <p>↓</p> <p>Discussão das vantagens em se desenvolver esse estudo em culturas de leveduras.</p> <p>↻</p> <p>Planificação da actividade experimental que permita responder à questão problema "Será que o vanádio como poluente poderá afectar a saúde humana?" .</p> <p>Resposta a diversas questões que permitam uma avaliação de competências gerais do âmbito das ciências experimentais.</p> <p>↻</p> <p>Cuidados de assepsia via seca e via húmida.</p> <p>↓</p> <p>Preparação de meios: líquidos YPD; sólidos YPD e YPD-V (25 e 75 mM NH₄VO₃).</p> <p>Aplicar os conceitos de concentração mássica e de concentração molar. Medições de massas e de volumes.</p> <p>↻</p> <p>Inoculação de levedura em 20 mL de meio líquido YPD e crescimento 16 h a 28 °C.</p> <p>↻</p> <p>Inoculação de 100 mL de meio líquido YPD com 3 mL da cultura obtida anteriormente e registo da turbidez_{640 nm} da cultura até atingir 0,8.</p> <p>↓</p> <p>Inoculação de meios YPD e YPD-V sólidos com 0,3 mL de cultura na fase exponencial média de crescimento da <i>S. cerevisiae</i>.</p> <p>↻</p> <p>Crescimento em incubadora a 28 °C durante 72 h.</p>  <p>Obtenção dos lisados celulares (recolha das células e lavagem com água bidestilada; resuspensão em tampão fosfato 0,1 M, pH 7; lise com homogeneizador de ultra-sons 3 vezes 5 min (0,1 ; 1)).</p> <p>↓</p> <p>Armazenamento de sobrenadantes pós-12000 g a -20 °C.</p> <p>↻</p> <p>Determinação do conteúdo proteico no sobrenadante pós-12000 g pelo método de Lowry.</p> <p>↻</p> <p>Obtenção de curvas de reacção a 405 nm utilizando o p-NPP como substrato. Determinação da actividade específica da ALP.</p> <p>↻</p> <p>Conclusões e resposta à questão problema.</p> <p>↓</p> <p>Resposta pós actividade experimental ao mesmo questionário apresentado antes da realização da actividade experimental . Resposta a um questionário para avaliar o grau de satisfação dos alunos.</p>

4.4. Reagentes

- Agar, p.a., MERCK, Darmstadt;
- Albumina de soro bovino, Sigma, St. Louis;
- Carbonato de sódio anidro, p.a., 99,5%, MERCK, Darmstadt;
- Dihidrogenofosfato de sódio, p.a., 99,0%, MERCK, Darmstadt;
- Extracto de levedura, Sigma, St. Louis;
- Folin-Ciocalteu, p.a, Sigma, St. Louis;
- Glucose p.a., MERCK, Darmstadt;
- Hidrogenofosfato de sódio anidro, p.a, 99%, MERCK, Darmstadt;
- Hidróxido de sódio, p.a, 99,0%, MERCK, Darmstadt;
- Metavanadato de amónio p.a, 99,0%, MERCK, Darmstadt;
- p-nitrofenilfosfato, p.a, Sigma, St. Louis;
- Peptona, Sigma, St. Louis;
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado, p.a, 99,5%, Panreac, Barcelona;
- Tris (hidroximetil) aminometano, p. a., 99,9%, MERCK, Darmstadt;
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, p.a., 99,9%, MERCK, Darmstadt.

4.5. Material

- Algodão hidrófobo;
- Ansa de crómio - níquel;
- Balão volumétrico de 50 mL;
- Balão volumétrico de 250 mL;
- Caixas de Petri;
- Células de absorção molecular de 1 cm percurso óptico;
- Copo de precipitação de 10 mL;
- Cooler;
- Erlenmeyer de 25 mL;
- Erlenmeyer de 100 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Esguicho de água destilada;
- Espátulas;
- Fita indicadora de esterilização em autoclave;
- Folha de alumínio;
- Frascos graduados para autoclave;
- Luvas;
- Micropipeta automática (P_{200} ; P_{1000});
- Microtubos de 1,5 mL;
- Pipetas de 1 mL;
- Pipetas de 5 mL;
- Pipetas de Pasteur;
- Proveta de 25 mL;
- Proveta de 100 mL;

- Pompete;
- Pontas de micropipeta;
- Tetina;
- Tubos de ensaio;
- Vidros de relógio.

4.6. Equipamento

4.6.1. Laboratorial

- Agitador tipo vórtex;
- Autoclave de marca Express, modelo microclave;
- Autoclave de marca Selecta, modelo microclave;
- Balança analítica de marca Mettler, modelo AE 200;
- Balança analítica de marca Mettler Toledo, modelo PB 303;
- Banho termostaticado de marca Memmert, modelo WNB14;
- Banho termostaticado com agitação de marca Memmert, modelo 3200 R;
- Espectrómetro absorção molecular, feixe duplo, de marca Hitachi, modelo U1500;
- Espectrómetro absorção molecular, feixe duplo de marca Hitachi, modelo U2000, com banho termostaticado e sistema de circulação de água de marca Grant;
- Estufa de incubação de marca Kowell, modelo D2-1;
- Estufa de incubação de marca Binder, modelo WTC;
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons, Branson Sonifier, modelo 450;
- Supercentrífuga de marca Hermle, modelo Z323K;
- Vórtex de marca Heidolph, modelo Reax 2000.

4.6.1. Audio-visual

- Computador portátil;
- Projector de vídeo;
- Quadro e marcadores.

5. Resultados e discussão

5.1. Resultados obtidos pelo mestrando

Ao assumir-se que o alvo principal deste trabalho foi investigar, com alunos de duas turmas-piloto da escola secundária Dom Manuel Martins de Setúbal, a acção do vanádio, no crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, contextualizado à influência dos metais sobre os seres vivos, procurou-se criar abordagens laboratoriais que permitissem desenvolver competências no âmbito das ciências experimentais de fácil aplicação no ensino secundário. Nesse contexto tentou-se motivar os alunos para a importância dos metais, em particular o vanádio, um elemento com distribuição ubíqua na natureza cuja ocorrência média na crosta terrestre é da ordem dos 150 ppm. Destacou-se também que actividades humanas como a queima de combustíveis fósseis, a produção e utilização de fitofármacos, bem como, a produção de ligas metálicas contribuem para aumentar drasticamente os níveis de vanádio em algumas regiões do globo, tornando-o um poluente. Referiu-se ainda que embora este metal de transição pareça ser essencial, em quantidades traço, para alguns microrganismos, torna-se tóxico quando ingerido em quantidade excessiva. Destacou-se ainda que o metavanadato de amónio (V^{+5}), amplamente utilizado na indústria química é um dos compostos de vanádio que em doses elevadas apresenta toxicidade para os seres vivos, razão pela qual foi escolhido como agente químico de *stress* para esta acção. No seguimento dessa introdução caracterizou-se sumariamente a estrutura da fosfatase alcalina (ALP), um glico-enzima com zinco no seu centro activo, cujo papel na célula está relacionado com a sua participação na diferenciação e crescimento celular, em vias de sinalização e apoptose que podem ser afectados pela pressão ambiental de metais, como o vanádio. Explicou-se ainda que os factos descritos anteriormente justificam a realização de estudos que permitam esclarecer os efeitos do vanádio no ALP, um enzima de importância metabólica capital. Houve também a preocupação de esclarecer os estudantes que este tipo de experiências podem ser ilustradas, recorrendo a leveduras, seres unicelulares, eucariotas, como a *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, nativa de mostos de vinho do Alentejo, excelentes para treinar estudantes em actividades que envolvam a química, o ambiente e a vida, uma vez que são de fácil cultura em condições controladas, e que por serem GRAS vão ao encontro das leis de segurança microbiológica e de protecção animal que recomendam o desenvolvimento de modelos alternativos aos animais em estudos prévios de toxicidade.

Considerando que o sucesso deste tipo de acções obriga o docente à montagem e teste prévio de todas as etapas laboratoriais que vão ser executadas pelos alunos, o docente procedeu à pesquisa bibliográfica que permitiu a planificação e redacção da

actividade experimental, enquadrado na metodologia descrita anteriormente, à elaboração de um texto de apoio para os alunos (parte II) bem como a orientações no procedimento experimental, decisão que permitiu a aferição dos métodos e a calendarização adequada de cada fase da acção.

Os resultados prévios obtidos pelo docente referentes ao acompanhamento do crescimento da cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ estão representados na figura 5.1.

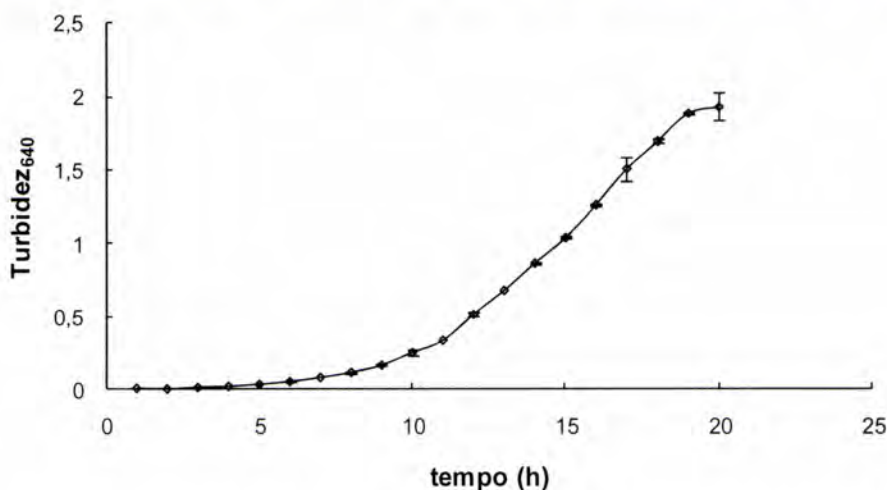


Figura 5.1. Curva de crescimento da levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ obtida a 28°C a partir de leituras de turbidez a 640 nm. Cada ponto representa a média aritmética de três replicados \pm desvio-padrão.

A curva de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ segue o perfil descrito na bibliografia consultada, com uma fase Lag até às 6 h de crescimento, sendo a fase exponencial média (turbidez_{640nm} 0,8-1,0) atingida 12 h após o início da cultura (Madigan, 2004).

A figura 5.2. mostra-nos que no intervalo de concentração seleccionado (0-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o método de Lowry permite obter uma relação linear entre a $A_{720\text{nm}}$ e a concentração de BSA, exibindo coeficientes de correlação superiores a 0,9985 e estável por um intervalo de tempo adequado à realização da actividade experimental. Por outro lado, a figura 5.3 revela-nos que ocorreu uma diminuição significativa do conteúdo proteico dos sobrenadantes pós-12000 g obtidos a partir de homogeneizados de células crescidas a 28°C, durante 72 h, na presença de metavanadato de amónio, calculado por interpolação gráfica da curva de calibração representada na figura 5.2. Assim a relação matemática entre $A_{720\text{nm}}$ e a concentração de BSA em $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi determinada a partir da curva de calibração:

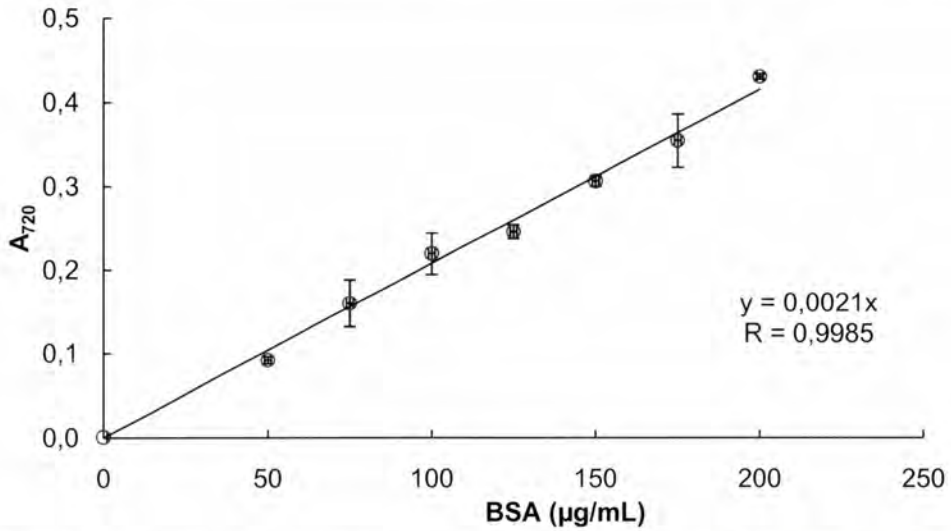


Figura 5.2. Curva de calibração A_{720nm} vs [proteína] traçada utilizando BSA como proteína padrão, tendo em vista a quantificação de proteínas na fracção celular pós-12000 g, obtida a partir homogeneizados celulares de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD, a 28°C, durante 72 h.

Para o ensaio controlo, o cálculo do conteúdo total em proteína do extracto obtido a partir de células crescidas na ausência de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) expresso em µg/mL foi determinado pela equação:

$$A_{720} = 0,00211 \times C$$

Apresenta-se na figura 5.3. o conteúdo proteico (mg) determinado nos sobrenadantes pós-12000 g de células crescidas durante 72 h a 28 °C em meio sólido YPD ou YPD-V com 25 ou 75 mM de metavanadato de amónio.

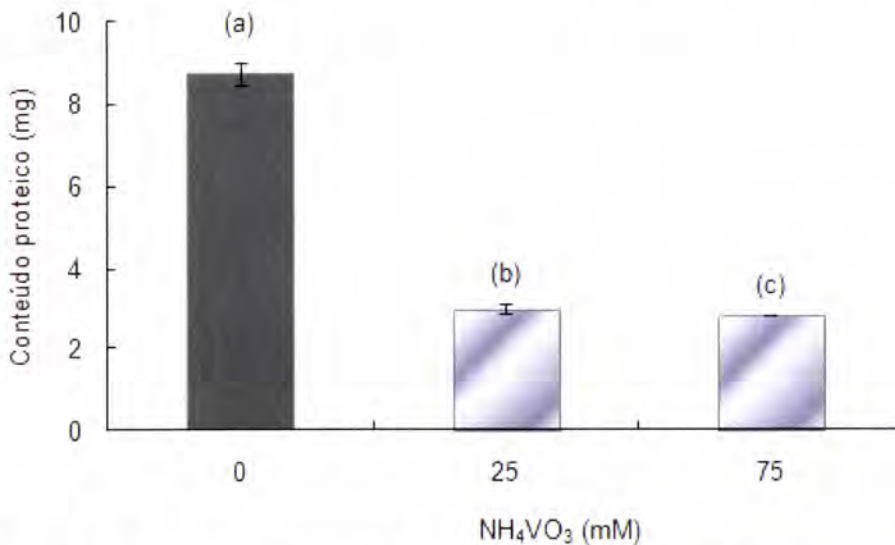


Figura 5.3. Efeito do metavanadato de amónio no conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g, de homogeneizados celulares de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V, a 28°C, durante 72 h. Os resultados representam a média de três experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$). Análise ANOVA I seguida pelo teste de Tuckey.

No que diz respeito à detecção e quantificação da actividade fosfatase alcalina (ALP) a figura 5.4. revela que é possível obter curvas de reacção reprodutíveis, com linearidade adequada para o cálculo de velocidade inicial de reacção (v_0), exibindo coeficientes de correlação superiores a 0,999. O cálculo da actividade específica recorreu à equação:

$$v_0 = ((m \times 60)/18,5)/m_p$$

onde m corresponde ao coeficiente angular das curvas de reacção obtidas por leituras em contínuo de A_{405nm} para a ALP, 18,5 corresponde ao coeficiente de absorvidade específica expresso em mM^{-1} do p-nitrofenolato, o produto da reacção e m_p a massa de proteína na mistura de ensaio. A rapidez e a reprodutibilidade com que os resultados foram obtidos mostram a adequação da estratégia adoptada para a actividade experimental, ilustrando como podemos detectar reacções químicas nos organismos vivos, bem como, a influência dos metais nos processos metabólicos em que essas reacções estão inseridas.

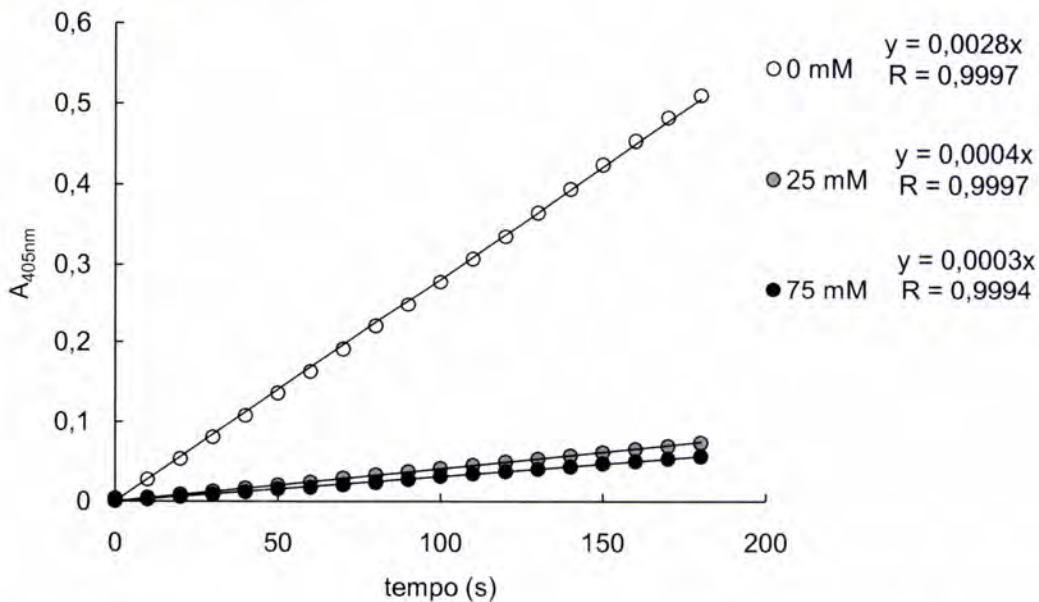


Figura 5.4. Curvas de reacção A_{405nm} vs t traçada para o enzima ALP presente na fracção celular pós-12000 g , obtida a partir homogeneizados celulares de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V contendo 25 mM ou 75 mM de NH_4VO_3 a 28°C, durante 72 h, utilizando o p-NPP como substrato sintético.

A figura 5.5. representa a actividade específica ALP, para diferentes ensaios na ausência e na presença de metavanadato de amónio na qual pode-se observar que na presença de vanádio ocorre um decréscimo da actividade específica ALP de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Deste modo, estes resultados permitem especular que a inibição do crescimento da levedura em estudo, pelo vanádio, está relacionada

com o decréscimo da actividade específica ALP. O elemento em estudo afecta o crescimento da levedura utilizada. Considerando que esta resposta foi obtida com um organismo eucariota é admissível que o mesmo tipo de resposta possa acontecer em outros sub-sistemas celulares eucariotas, pelo que a presença de vanádio em níveis ambientais elevados possa causar problemas de saúde pública.

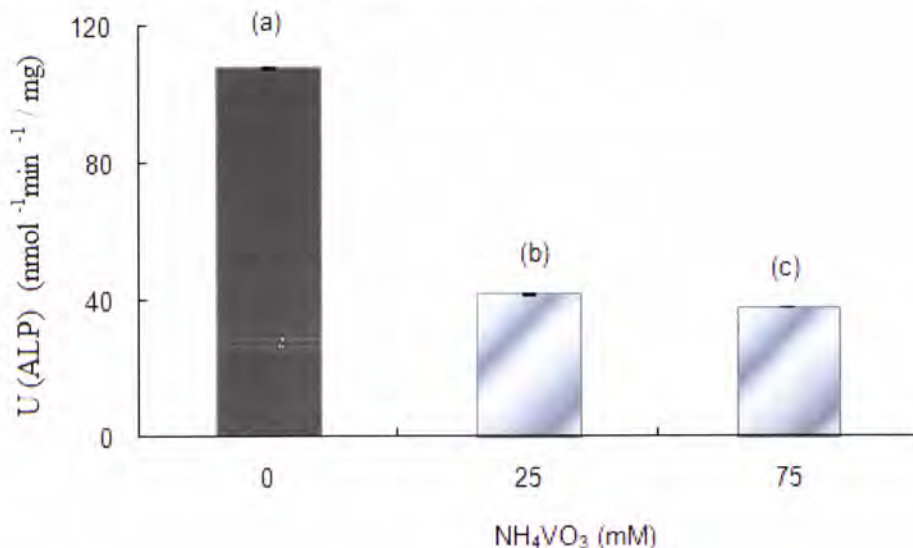


Figura 5.5. Efeito do metavanadato de amónio na actividade específica ALP do sobrenadante pós-12000 g, de homogeneizados celulares de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V, a 28°C, durante 72 h. Os resultados representam a média de três experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$). Análise ANOVA I seguida pelo teste de Tuckey.

5.2. Resultados obtidos pelos alunos

Considerando que o desenvolvimento da acção decorreu em seis sessões laboratoriais (**a**-preparação do meio YPD líquido e dos meios sólidos YPD e YPD-V, **b**-inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez, **c**-inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h, **d**-extracção do enzima ALP de leveduras crescidas nos diferentes meios sólidos, **e**-determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry, **f**-determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP)), o confronto dos alunos de cada turma-piloto com os aspectos teóricos do trabalho recorrendo à pesquisa bibliográfica e à auto-descoberta orientada pelo docente, potenciou o sucesso da execução experimental, bem como, o incremento de competências em todas as fases avaliadas desta acção que discutir-se-á na secção 5.3.

Tal como descrito na secção 4.1.2., o desenvolvimento desta actividade científico-pedagógica, envolveu alunos da Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal, onde foram seleccionados dois sub-grupos (I e II) entre os alunos que frequentavam uma turma-piloto da disciplina de Física e Química A (ano I) do 10º ano de escolaridade, bem como, um terceiro grupo (III), seleccionado entre os alunos que frequentavam uma turma-piloto da disciplina de Área de Projecto do 12º ano de escolaridade. O grupo I foi ainda dividido em sub-grupos de 2-3 alunos que procederam à preparação de soluções e meios de cultura, à inoculação de meios líquidos YPD e ao acompanhamento do crescimento da *S. cerevisiae* UE-ME₃ por turbidimetria, à inoculação de meios sólidos YPD e YPD-V com *S. cerevisiae* UE-ME₃ e à determinação qualitativa dos efeitos do metavanadato de amónio, com concentração de 25 e 75 mM, sobre o crescimento de leveduras, assim como, à extracção de células de cada tratamento e obtenção dos respectivos extractos celulares que foram posteriormente utilizados, pelos alunos dos grupos II e III, na quantificação de proteínas e do enzima ALP. A participação activa dos alunos motivada pelo objectivo geral do trabalho, previamente descrito e discutido com todos os participantes da acção, respeitando obviamente o estado de maturação e o nível de conhecimentos prévios de que eram portadores, facilitou a concretização dos objectivos específicos definidos para esta fase da acção. Algumas evidências da execução experimental e os resultados obtidos pelos alunos são ilustrados nas figuras 5.6-5.14.

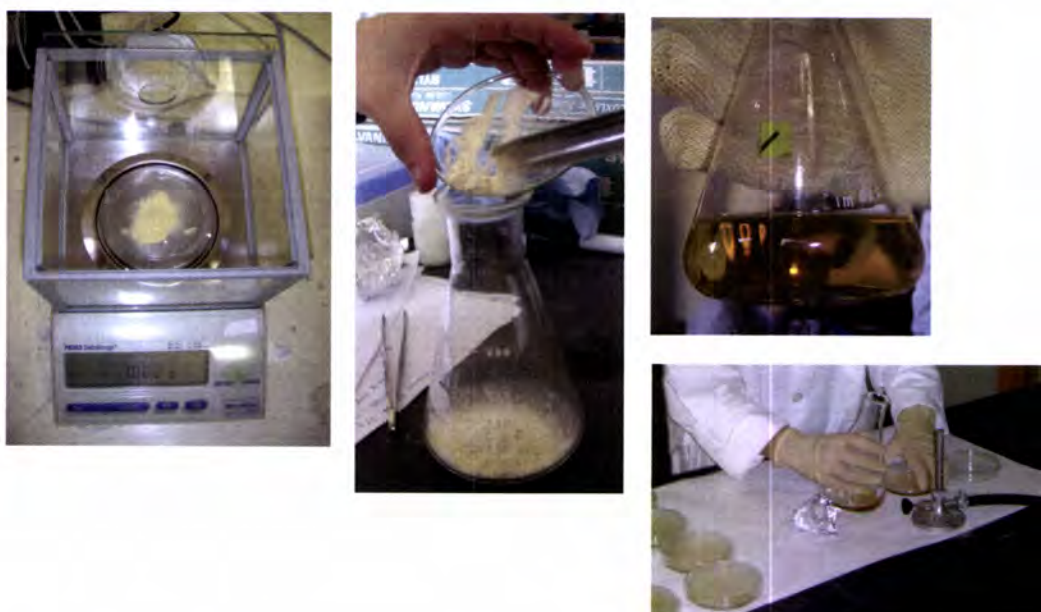


Figura 5.6. Alguns passos da preparação dos meios YPD líquido e sólido, YPD-V, por elementos pertencentes ao grupo I.

A figura 5.6. ilustra alguns actos relativos à preparação de meios de cultura, nomeadamente pesagem em balança analítica de alguns constituintes, confirmação de uma boa esterilização pelo calor húmido em autoclave e distribuição de meio sólido pelas placas de Petri em ambiente estéril pelo calor seco ao bico de Bunsen ou lamparina.

A leitura da turbidez a 640nm do meio de cultura ao longo do tempo, realizada no espectrómetro de absorção molecular de feixe duplo, da marca Hitachi, modelo U1500, ilustrada na figura 5.7., permitiu acompanhar com sucesso o crescimento da cultura e obter a representação gráfica apresentada na figura 5.8. Como o intervalo de leituras decorreu ao longo de 14 h, o mestrando procedeu à inoculação do meio líquido pelas 0:00 h do dia da experiência e leitura dos primeiros dois pontos da representação, de modo a permitir que os alunos acompanhassem o início do crescimento exponencial da cultura para usar a cultura com 0,8 turbidez a 640nm como inóculo nos meios YPD e YPD-V sólidos. Esta simplificação foi possível tomando como referência a curva de crescimento obtida pelo mestrando, figura 5.1.

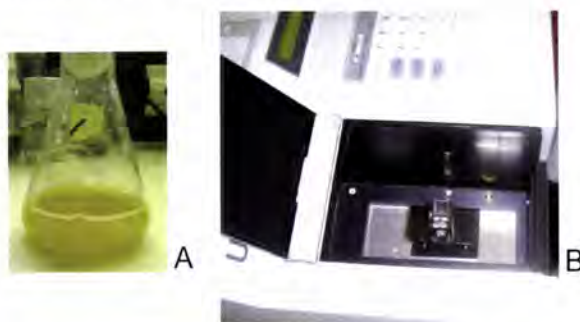


Figura 5.7. Cultura em meio líquido YPD de *S. cerevisiae* UE-ME₃ (A) e acompanhamento do seu crescimento por leitura da turbidez a 640nm (B) por alunos pertencentes ao grupo I.

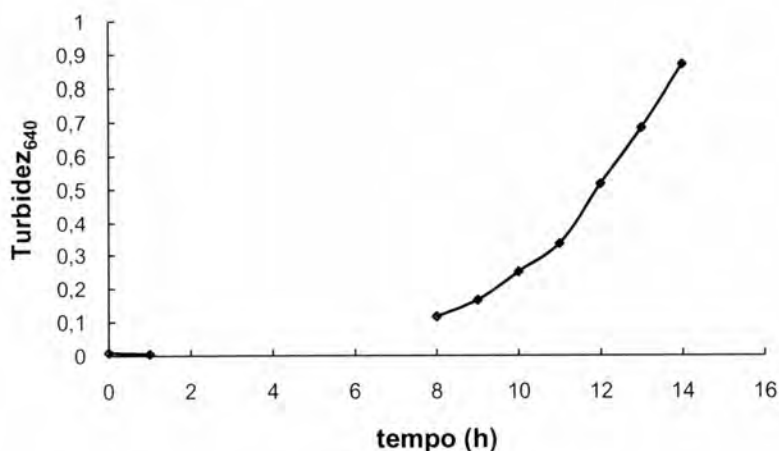


Figura 5.8. Registo dos valores de turbidez a 640 nm de cultura em meio YPD líquido de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a 28 °C, por alunos pertencentes ao grupo I.

A figura 5.9. ilustra passos de inoculação de meios sólidos YPD e YPD-V com *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescimento a 28 °C em incubadora durante 72 h e posterior determinação qualitativa dos efeitos do metavanadato de amónio, na concentração de 25 e 75 mM, sobre o crescimento da levedura. Alguns alunos tiveram pela primeira vez oportunidade de inocular microrganismos em meio sólido, bem como observar o seu crescimento em placa. A observação do crescimento em placa de *S. cerevisiae* UE-ME₃ na ausência e na presença de vanádio permitiu avaliar a influência negativa deste metal de transição no crescimento de células eucariotas.



Figura 5.9. Inoculação de meio sólido YPD-V com *S. cerevisiae* UE-ME₃ (A), incubação de culturas de levedura em incubadora com temperatura controlada a 28°C (B), seguida de observação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos (C). Tarefas realizadas por alunos pertencentes ao grupo I.

A figura 5.10. evidencia alguns passos da recolha de células crescidas em meios sólidos YPD e YPD-V, bem como, células sedimentadas por centrifugação diferencial onde os alunos puderam observar uma diferença acentuada na quantidade de células obtidas nos diferentes meios de cultura (C). Por outro lado, a figura 5.10. exhibe o funcionamento do homogeneizador com sonda de ultra-sons (D), o extracto celular obtido (E), assim como, a super-centrífuga utilizada pelos alunos do grupo I para obter os sobrenadantes pós-12000 g, posteriormente utilizados pelos alunos dos grupos II e III na quantificação de proteínas e do enzima ALP.

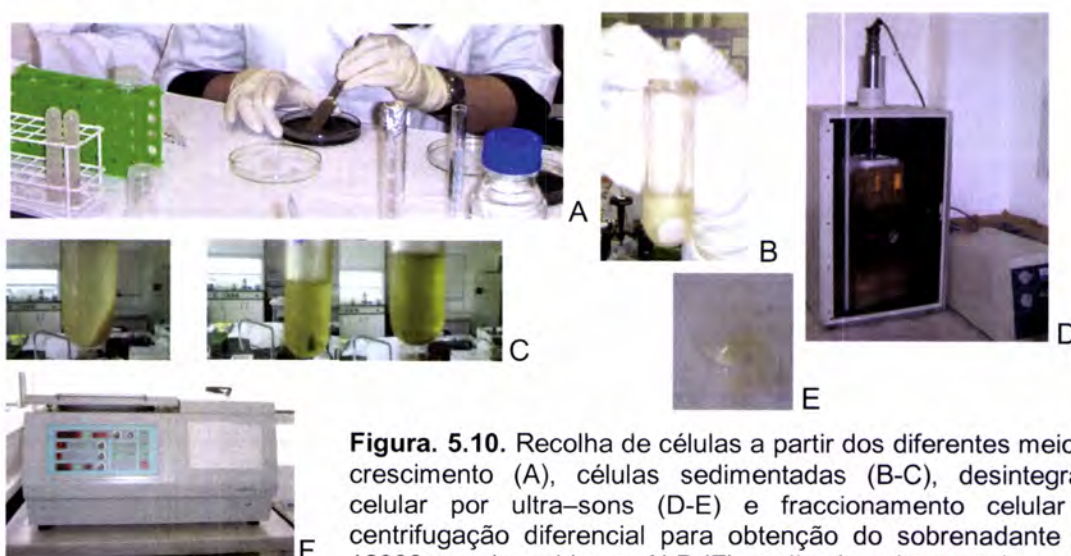


Figura. 5.10. Recolha de células a partir dos diferentes meios de crescimento (A), células sedimentadas (B-C), desintegração celular por ultra-sons (D-E) e fraccionamento celular por centrifugação diferencial para obtenção do sobrenadante pós-12000 g enriquecido em ALP (F), realizado pelo grupo I.

O grupo II dedicou-se à quantificação de proteínas pelo método de Lowry, recorrendo à albumina do soro bovino como padrão para a construção de curvas de calibração. Os alunos tiveram oportunidade de preparar com rigor soluções como o reagente de Lowry utilizando pipetas volumétricas, controlando o volume com propipetas (figura 5.11. A, B). Por outro lado também puderam utilizar o cálculo mental para estimar o volume de água necessário para diluir $\frac{1}{2}$ o reagente de Folin-Ciocalteu. No seguimento desta fase preparatória os estudantes construíram a curva de calibração para estimar o valor da concentração de proteínas nas amostras de extracto de levedura, recorrendo aos reagentes previamente preparados. Durante o processo os discentes observaram durante a formação de um gradiente de cor azul intensa dependente da concentração de BSA em cada tubo. Aproveitando o plano de cores, os alunos foram convidados a interpolar visualmente a concentração de proteínas presente nos sobrenadantes pós-12000 g e a detectar amostras que eventualmente caíssem fora da curva para proceder às diluições adequadas (figura 5.11. C, D). As leituras de absorvência realizadas no espectrómetro de absorção molecular Hitachi-U2001 permitiram confirmar a observação visual.

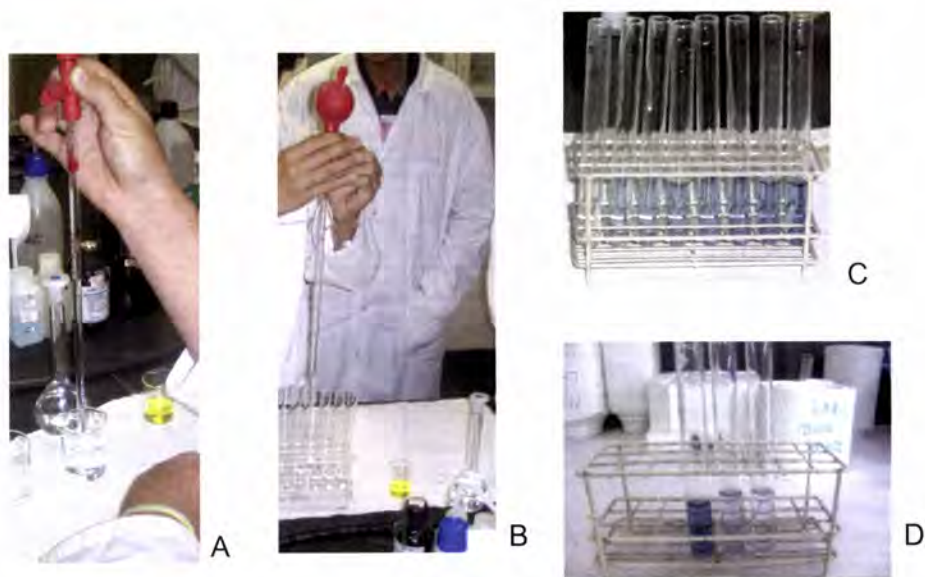


Figura 5.11. Evidências de operações laboratoriais para a obtenção da curva de calibração de BSA tendo em vista a quantificação de proteínas no sobrenadante pós-12000 g. Preparação do reagente de Lowry (A); Preparação de soluções-padrão com concentração crescente de BSA e de amostras do sobrenadante pós-12000 g (B); Gradiente de cor característico da curva de calibração pelo método de Lowry (C); Coloração das amostras do sobrenadante pós-12000 g (D).

As leituras de absorvência a 720 nm realizadas pelos alunos permitiram construir uma curva de calibração, recorrendo ao método dos mínimos quadrados que pode ser caracterizada pelo valor de ordenada na origem de 0,000, coeficiente angular de 0,0037 e

coeficiente de correlação de 0,988 (figura 5.12.). A abordagem estatística aqui referida permitiu ilustrar a utilidade das regressões lineares na quantificação de materiais, bem como, confirmar por espectrometria de absorção molecular e tratamento estatístico desses resultados, a resposta inferida por observação à vista desarmada do incremento de cor das soluções-padrão com a concentração de BSA, bem como, a alteração de cor dos estratos pós-12000 g obtidos em cada tratamento. Na aula foi igualmente discutida a qualidade da curva de calibração obtida pelos alunos, nomeadamente no que diz respeito ao valor da ordenada na origem, coeficiente angular e coeficiente de correlação que mostram um pequeno afastamento dos resultados obtidos pelo docente. Os desvios observados puderam ser atribuídos à falta de prática dos estudantes na pipetagem de pequenos volumes, assim como, ao facto de os resultados terem sido obtidos por diferentes intervenientes, facto que permitiu ainda explorar com os alunos a importância do rigor das medições de massa e volume em ensaios experimentais de química e/ou bioquímica. No entanto pôde-se concluir que os resultados obtidos são bons tendo em conta os constrangimentos da aula.

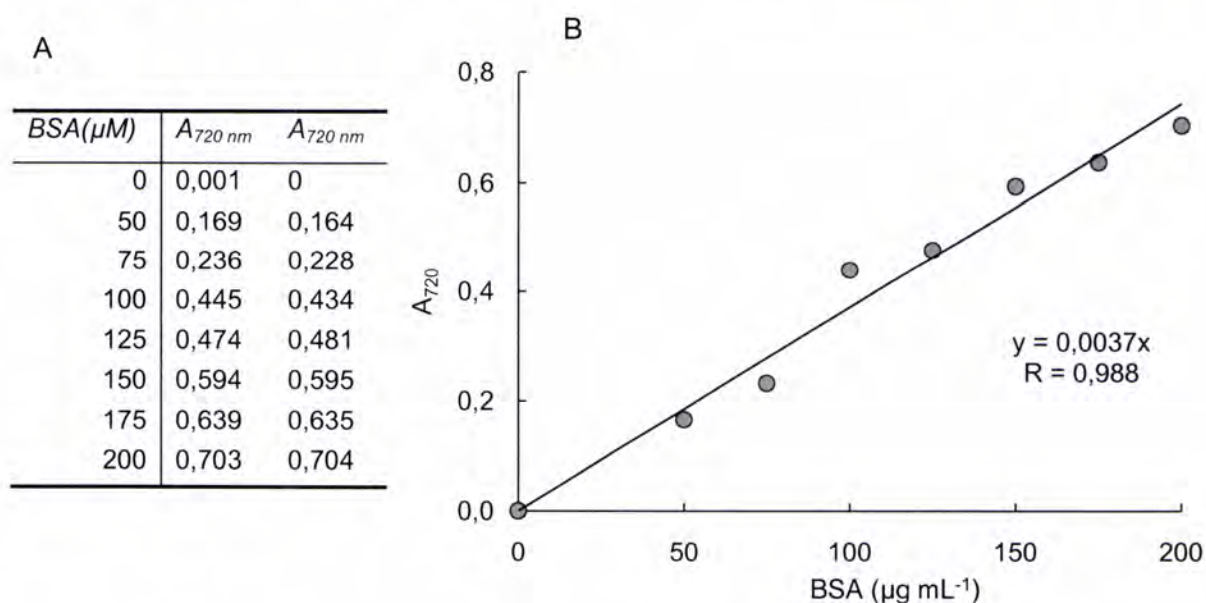


Figura 5.12. Resultados experimentais obtidos pelos alunos recorrendo ao método de Lowry para a quantificação de proteínas. Valores de $A_{720\text{ nm}}$ de cada solução-padrão registados pelos estudantes (A); curva de calibração gerada por regressão linear dos resultados obtidos a partir de cada solução-padrão (B).

Face ao exposto os alunos foram convidados a calcular o conteúdo proteico dos sobrenadantes pós-12000 g por interpolação gráfica dos valores de absorvência na curva de calibração e considerando as diluições efectuadas. Com recurso a folha de Excel os estudantes representaram graficamente o conteúdo proteico em cada situação

experimental (figura 5.13.). Após discussão entre os elementos do grupo moderada pelo docente, os alunos concluíram que o conteúdo em proteínas dos sobrenadantes pós-12000 g diminuiu acentuadamente com a concentração de metavanadato de amónio no meio de cultura, facto que indicia morte celular causada pelo elemento vanádio, sendo deste modo alcançado um dos objectivos desta acção que era demonstrar a influência dos metais sobre os seres vivos.

NH_4VO_3 (mM)	$A_{720\text{ nm}}$	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
0	0,520	716,22
25	0,241	318,24
75	0,215	280,41

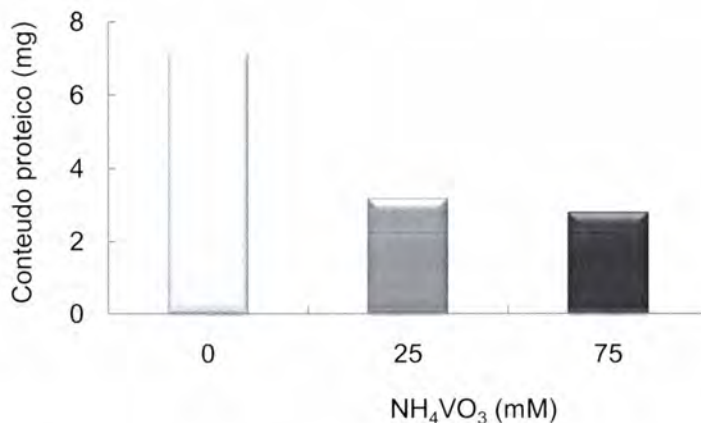


Figura 5.13. Efeito do metavanadato de amónio no conteúdo proteico dos sobrenadantes pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença do metal.

O grupo III dedicou-se à determinação da actividade ALP, utilizando o p-nitrofenilfosfato como substrato sintético. Neste ensaio os estudantes tiveram oportunidade de realizar a pipetagem de pequenos volumes recorrendo a micropipetas analíticas durante a preparação das misturas de reacção em células de absorção de espectrómetro de absorção molecular (figura 5.14.).



Figura 5.14. Evidências de operações laboratoriais desenvolvidas na obtenção das curvas de reacção para determinação da actividade enzimática ALP nos sobrenadantes pós-12000 g, utilizando p-NPP como substrato.

No seguimento destas operações os estudantes tiveram oportunidade de ler em continuo a $A_{405\text{nm}}$ ao longo do tempo (s) em cada célula de absorção que foi registada em folha de cálculo e utilizada para posteriormente representarem curvas de reacção de $A_{405\text{nm}}$ em função do tempo (s). Mais uma vez os alunos tiveram oportunidade de aplicar o método dos mínimos quadrados para calcular v_0 (s^{-1}) obtido a partir do coeficiente angular das curvas de reacção, cujos coeficientes de correlação variaram entre 0,986 e 0,993 (figura 5.15.). Em seguida os estudantes calcularam a actividade enzimática da ALP, expressa em unidades de concentração recorrendo à equação:

$$V_0 (\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}) = 60 v_0 (\text{s}^{-1}) / \epsilon b$$

onde ϵ refere-se ao coeficiente de absorvidade molar do p-nitrofenolato a 405 nm e b ao percurso óptico de 1 cm. Posteriormente calcularam a actividade específica recorrendo à equação:

$$U (\text{nmol min}^{-1}/\text{mg}) = (V_0 (\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}) / [\text{proteína}] (\text{mg L}^{-1})) \times 1000$$

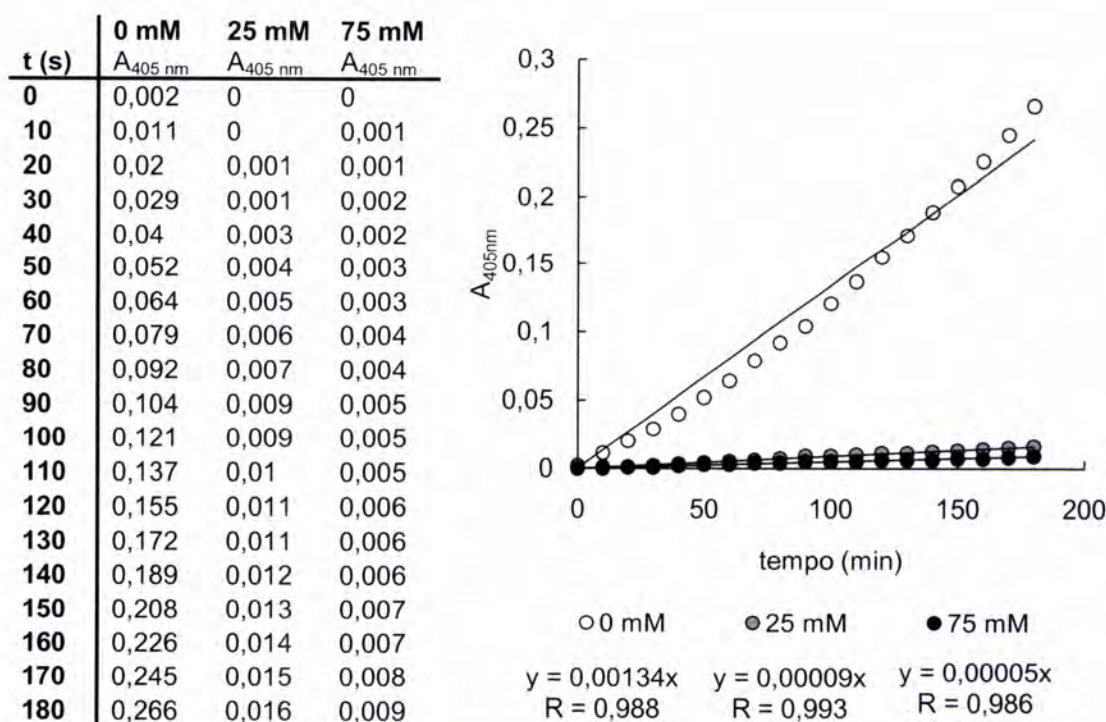


Figura 5.15. Resultados experimentais obtidos pelos alunos na determinação da actividade ALP. Curvas de reacção $A_{405\text{nm}}$ vs t traçadas para o enzima ALP presente na fracção celular pós-12000 g, obtida a partir de homogeneizados celulares de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD, na ausência e na presença de metavanadato de amónio, a 28 °C, durante 72 h, utilizando o p-NPP como substrato sintético.

Após representarem graficamente os valores de actividade específica em função da concentração de vanádio, os alunos discutiram as respostas obtidas, tendo em conta algumas considerações teóricas que constam do texto de apoio e que tinham sido apresentadas aos estudantes durante a elaboração dos protocolos experimentais, nomeadamente o facto de o valor da actividade específica determinado em condições de saturação (excesso de substrato) expressarem a concentração de enzima no ambiente analisado. Assim, os alunos puderam concluir sem dificuldade que a quantidade de enzima ALP nos sobrenadantes pós-12000 g diminuiu significativamente em leveduras crescidas na presença de metavanadato de amónio (figura 5.16.). Na sequência desta observação, e tendo em conta que o enzima escolhido é um marcador da proliferação celular, os alunos puderam inferir que o sal de vanádio comportou-se como um inibidor da proliferação celular de leveduras quando no meio celular se encontra na concentração de 25 e 75 mM, facto que consubstancia algumas hipóteses anteriores onde se indicava que este agente metálico poderia ser um indutor de morte celular e como tal, tóxico para este eucariota unicelular, nativo do Alentejo, Portugal.

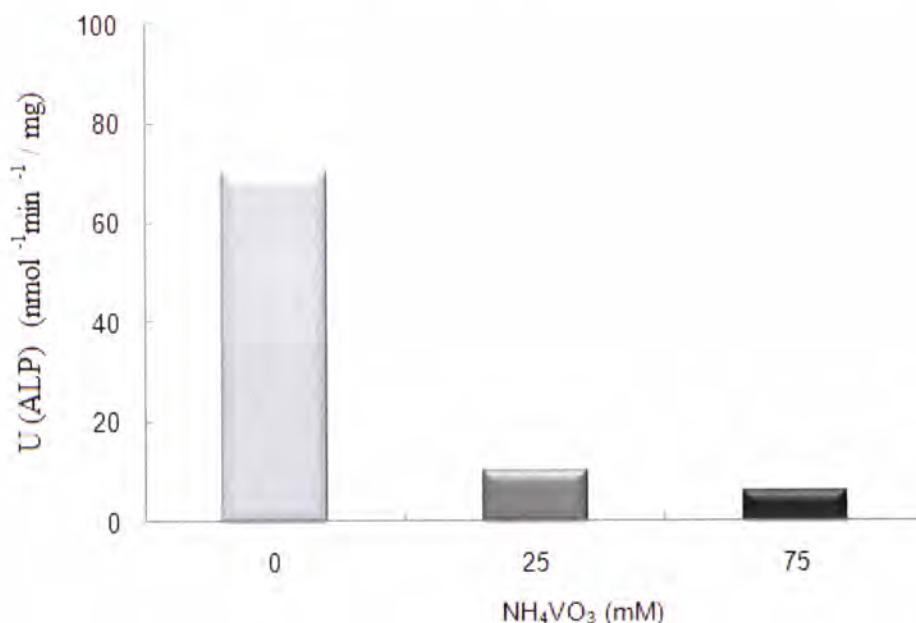


Figura 5.16. Efeito do metavanadato de amónio na actividade específica ALP presente no sobrenadante pós-12000 g, obtido a partir de homogeneizados celulares de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD ou YPD-V, a 28°C, durante 72 h.

5.3. Competências desenvolvidas pelos alunos e grau de satisfação

A planificação da aula, bem como, os protocolos experimentais desenvolvidos com a participação activa dos alunos, teve em conta o modelo biológico utilizado, alternativo aos modelos animais, a importância metabólica do enzima ALP como marcador da proliferação celular e os problemas ambientais gerados pela contaminação progressiva de aquíferos, solos e alimentos por metais e, neste caso particular, o vanádio.

A idade dos participantes apresentava um máximo gaussiano localizado em torno dos 16 anos de idade (52%). Tal como foi descrito na secção 2, a concretização dos objectivos pelos alunos foi avaliada utilizando uma série de perguntas-problema antes e após completar cada fase da actividade experimental. A análise estatística dos resultados antes e após a acção foi expressa num intervalo entre 0 e 100, sendo consideradas como estatisticamente diferentes as diferenças entre cada instante de avaliação, utilizando o teste t para amostras independentes. Uma análise mais detalhada dos resultados experimentais foi aplicada aos resultados obtidos em cada fase da actividade experimental (a, b, c, d, e, f) utilizando o ANOVA I, utilizando o software SPSS (v 16, SPSS Inc, Chicago, IL), licenciado para a Universidade de Évora. O acesso ao grau de satisfação pessoal dos alunos sobre esta actividade experimental foi conseguido utilizando um inquérito de opinião. Os resultados foram analisados pela % de respostas obtidas em cada item.

O valor médio obtido antes e após a actividade experimental (41%) e (63%), respectivamente, revelou um incremento positivo das competência desenvolvidas pelos alunos (figura 5.17.).

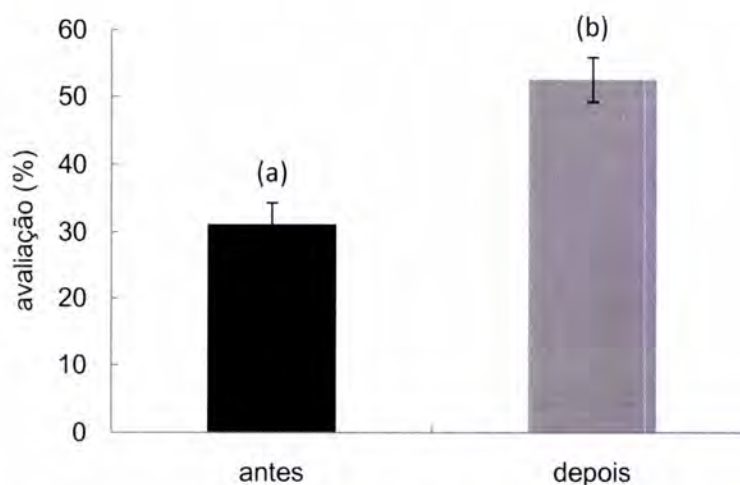


Figura 5.17. Análise estatística dos resultados antes e após a acção, expressa em %. Os resultados representam a média aritmética da avaliação de todas as respostas \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Por outro lado, o teste t-student revelou que este desenvolvimento representa um aumento significativo dos valores médios alcançados pelos alunos após o desenvolvimento da actividade experimental ($p < 0,01$).

Com maior detalhe foi também observado um efeito positivo e significativo em cada fase da actividade experimental ($p < 0,05$), antes e após o desenvolvimento da acção, onde a avaliação da concretização dos objectivos alcançados pelos alunos revelou um aumento do nível de competências e de conhecimentos em qualquer das fases, o qual é significativo na maioria das fases da actividade experimental avaliadas (figura 5.18.).

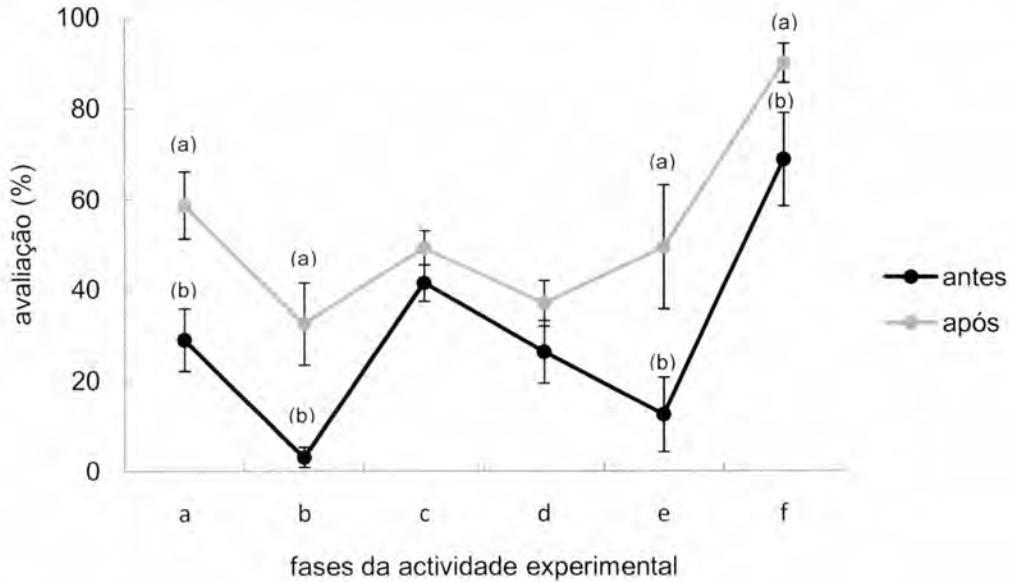


Figura 5.18. Análise dos resultados experimentais, aplicada à pontuação obtida em cada uma das seis fases da actividade experimental (a, b, c, d, e, f) recorrendo a ANOVA I. Os pontos de uma mesma fase assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Assim, na fase **a** relativa à preparação do meio YPD líquido e dos meios sólidos YPD e YPD-V observou-se um incremento de 30 pontos percentuais. Na fase **b** relativa à inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento microbiano por leituras de turbidez ocorreu uma variação positiva de 29 pontos percentuais. A fase **c** respeitante à inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h, parece ser aquela onde ocorreu um menor incremento de competências, uma vez que, apenas detectamos uma variação de 8 pontos percentuais. No entanto, para a fase **d** relativa à extracção do enzima ALP de leveduras crescidas nos diferentes meios sólidos, observamos um incremento de 11 pontos percentuais. Os factos aqui descritos revelam que em média ocorreu uma melhoria do grau de cumprimento das competências avaliadas no âmbito das Ciências Experimentais

por parte da maioria dos alunos envolvidos nesta actividade, integrados no sub-grupo I da turma-piloto da disciplina de Física e Química A (ano I) do 10º ano de escolaridade. Observou-se também uma melhoria do grau de cumprimento de competências em 37 pontos percentuais por parte dos alunos do grupo II que participaram na fase e, durante a qual se determinou o conteúdo em proteínas pelo método de Lowry.

Os alunos que frequentavam a turma-piloto da disciplina de Área de Projecto do 12º ano de escolaridade, constituintes do grupo III que se empenharam na determinação da actividade enzimática ALP, fase f, estão entre os que apresentaram um incremento elevado de competências, na ordem dos 22 pontos percentuais.

O inquérito de opinião efectuado para avaliar o grau de satisfação (quadro 5.1.), revelou que 85 % dos participantes consideraram o grau de dificuldade adequado, 67 % tomaram como boa a sua duração e classificaram como adequados os meios de trabalho. Por outro lado, 56 % dos estudantes referiram que gostaram mais de poder trabalhar e pôr em prática actividades laboratoriais, bem como, ter oportunidade de contactar com aparelhos e substâncias novas que possibilitaram a obtenção de resultados interessantes. Embora 44 % dos participantes não tenham considerado aspectos menos bons no decorrer desta actividade é de referir que 37 % tomaram como aspecto negativo os tempos de espera relacionados com a esterilização do material e o acompanhamento da cultura dos microorganismos. Tomou-se em consideração este aspecto para optimização futura, sem contudo comprometer o acto de ensinar cuidados de assépsia e desenvolver a paciência para adquirir resultados experimentais. Contudo 78 % dos alunos envolvidos nesta actividade consideraram agradável o processo de ensino-aprendizagem.

O inquérito de opinião também revelou que o universo de alunos abrangido continha 41 % de indivíduos com gosto pela área científica da Engenharia, 18 % com gosto pelas Ciências experimentais (Biologia, Física, Química e Geologia) e 11 % pelas Ciências da saúde. Os alunos participantes sugeriram (63 %) que a escola deverá continuar a oferecer aos jovens oportunidades como esta, de modo a proporcionar um contacto mais directo com este ambiente e actividades.

A resposta ao inquérito para avaliação do grau de satisfação por concordância frásica (quadro 5.2.), revelou que apenas 26 % dos participantes admitiram que este trabalho ajudou a escolher a sua carreira futura. No entanto, 78 % consideraram que se sentiram participantes de trabalho científico desenvolvido por profissionais e 96 % revelaram que a componente prática do trabalho foi importante para compreender os aspectos teóricos e entender a sua aplicabilidade. Por outro lado, 89 % dos estudantes revelaram que o professor os incentivou a reflectir e a questionar-se sobre a globalidade do processo.

Quadro 5.1. Avaliação do grau de satisfação dos alunos. (A) Sucesso da concretização da actividade desenvolvida com os alunos.

		Nº alunos	(%)
Grau de dificuldade	Adequado	23	85
	Não adequado	4	15
Duração	Boa	18	67
	Longa	8	29
	Curta	1	4
Meios de trabalho	Adequados	24	89
	Inadequados	3	11
O que os alunos gostaram mais	Da actividade experimental no seu todo (parte teórica e prática).	3	11
	Da componente prática.	3	11
	De trabalhar em grupo.	1	4
	De poder trabalhar e pôr em prática actividades laboratoriais. Ter oportunidade de contactar com aparelhos e substâncias novas. Realizar as actividades propostas e obter resultados interessantes.	15	56
	Da forma como os professores ensinavam.	0	0
	Não respondeu ou indicou mais do que uma alternativa.	5	18
O que os alunos gostaram menos	Esterilização do material.	2	7
	Apoio insuficiente em alguns momentos.	1	4
	Tempos de espera.	10	37
	Não há aspectos a considerar.	12	44
	Não respondeu ou indicação de mais do que uma alternativa.	1	4
	Extensão da turma para o desenvolvimento da actividade experimental.	1	4
Grau de satisfação e aprendizagem	Os alunos consideram que aprenderam de forma agradável.	21	78
	Os alunos consideram que aprenderam mas de forma um pouco aborrecida.	5	18
	Os alunos consideram que não aprenderam mas foi agradável ter-se trabalhado desta forma.	1	4
	Os alunos consideram que não aprenderam nem que foi agradável ter-se trabalhado desta forma.	0	0
Perspectivas futuras	Engenharia	11	41
	Saúde	3	11
	Ciências Experimentais (Biologia, Física, Química, Geologia)	5	18
	Energias Renováveis	1	4
	Não tem	7	26
Sugestões	Incluir ainda mais prática no desenvolvimento de trabalhos desta natureza.	4	15
	Permitir que os alunos cometam os seus próprios erros, para que tirem partido deles.	2	7
	Continuar a oferecer esta oportunidade aos jovens de modo a proporcionar um contacto mais directo com este ambiente e actividades.	17	63
	Melhor distribuição dos alunos pelas actividades desenvolvidas.	1	4
	Não respondeu ou incluiu mais do que uma alternativa.	3	11

Quadro 5.2. Avaliação do grau de satisfação dos alunos. (B) Grau de concordância.

	Concordam totalmente		Concordam		Discordam		Discordam totalmente		Não respondeu	
	Nº de alunos	%	Nº de alunos	%	Nº de alunos	%	Nº de alunos	%	Nº de alunos	%
Este trabalho ajudou os alunos a escolher a sua carreira futura.	0	0	7	26	12	44	7	26	1	4
Os alunos tiveram oportunidade de participar no trabalho científico desenvolvido por profissionais.	10	37	11	41	2	7	3	11	1	4
A componente prática do trabalho foi importante: aprendeu-se a teoria e como aplicá-la na prática.	11	40	15	56	0	0	0	0	1	4
O professor incentivou os alunos a reflectir e a questiona-los sobre todo o processo.	8	30	16	59	2	7	0	0	1	4
Este trabalho permitiu aos alunos executar as técnicas estudadas em vez de ficarem apenas a observar "como se faziam as coisas".	15	55	10	37	1	4	0	0	1	4
Formou-se um bom espírito de equipa que ajudou ao desenvolvimento do trabalho.	8	30	15	55	2	7	1	4	1	4
Adquiriram-se conhecimentos que podem vir a ser bastante importantes para o futuro profissional dos alunos.	7	26	15	55	0	0	4	15	1	4
O professor esteve sempre disponível para ajudar os alunos e para esclarecer todas as dúvidas que iam surgindo.	15	55	10	37	1	4	0	0	1	4
O professor ajudou os alunos a perceber para que serve o que se aprendeu na teoria.	13	48	11	41	2	7	0	0	1	4
Trabalhou-se com materiais e equipamentos que geralmente não se utilizam na escola.	14	51	10	37	1	4	1	4	1	4
Este trabalho permitiu aos alunos "entrarem na pele" de um cientista, vivendo "in loco" o dia-a-dia da actividade científica.	1	4	18	66	4	15	3	11	1	4
Os alunos gostariam de recomendar este trabalho aos seus amigos.	12	44	10	37	3	11	1	4	1	4

Os participantes (92 %) revelaram ainda que este trabalho permitiu-lhes contactar com as técnicas em vez de ficarem apenas a observar "como se faziam as coisas". O

bom espírito de equipa, a disponibilidade do professor para os esclarecer, bem como, o estabelecimento de pontes entre os conhecimentos teóricos e os aspectos práticos também construídos pelo docente contribuíram para o sucesso desta acção. A maioria dos estudantes (88 %) considerou que trabalharam com materiais e equipamentos que não são habitualmente utilizados na escola, facto que lhes permitiu “entrarem na pele de um cientista”, vivendo *in loco* o dia-a-dia da actividade científica. Como principal consequência, a grande maioria dos estudantes gostaria de recomendar este trabalho aos seus amigos.

6. Conclusões

A actividade descrita neste relatório agrupa um conjunto de experiências que envolveram a execução de protocolos simples que utilizam equipamentos, como balanças, centrífuga de bancada refrigerada, autoclave, banhos e incubadoras de temperatura controlada por termóstato e espectrómetro de absorção molecular, disponíveis em muitos laboratórios das escolas secundárias portuguesas, factos que tornam fácil a sua execução. A concretização dos objectivos traçados para a componente experimental desta actividade foi facilmente alcançada por grupos de dois ou três alunos que executaram ensaios laboratoriais com duração média de 2,5 a 3,0 h, recorrendo a papel, lápis e calculadora para as abordagens mais simples, ou folhas de cálculo previamente formatadas para registar e processar valores de turbidez/absorvência, lidos em função da concentração de materiais ou do tempo, com os quais construíram curvas de crescimento, de calibração e de reacção. A distribuição de tarefas de acordo com o grau de dificuldade e de maturidade dos alunos mostrou-se também frutuosa pois permitiu a preparação prévia de soluções e meios de cultura e a incubação de leveduras sem causar congestionamento e longas filas de espera em torno da balança, estufa e autoclave. Alguns aspectos atraentes desta acção passou pelo facto de os estudantes poderem pesar materiais e utilizar diferentes dispositivos para medir volumes, observar e registar o crescimento de microorganismos, bem como, apreciar a influência do metal de transição vanádio sobre esse parâmetro, tendo concluído que a presença de vanádio no meio de cultura na concentração de 25 e 75 mM inibe o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, uma estirpe nativa do Alentejo e que se encontra depositada na colecção do laboratório de enologia da Universidade de Évora.

No seguimento da acção, os alunos procederam à determinação do conteúdo proteico no sobrenadante pós-12000 g constituído maioritariamente por fracção microssomal, citosol e ribossomas. Com esse fim procederam à construção prévia de curvas de calibração utilizando BSA como padrão, tendo compreendido a importância da aplicação da lei de Beer e do método dos mínimos quadrados na construção de curvas de calibração. Estes ensaios revelaram ainda que a presença de vanádio no meio de cultura diminuía acentuadamente o conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g.

O ensaio da fosfatase alcalina onde o para-nitrofenilfosfato (p-NPP) foi utilizado como substrato e a fracção pós-12000 g como fonte de enzima geraram a 37°C, valores de A_{405nm} lidos contra soluções branco que permitiram construir curvas de reacção com equações lineares do tipo $A_{405nm} = f(t)$, cujo coeficiente angular permitiu calcular a velocidade inicial da reacção para cada fracção. Os valores apresentados correspondem à média aritmética de 3 replicados afectados pelo desvio-padrão. Nas condições

experimentais de cultura descritas no procedimento experimental, os estudantes puderam observar um decréscimo da ordem dos 86 % e 91 % da actividade ALP de leveduras crescidas em meios YPD-V com metavanadato de amónio na concentração de 25 e 75 mM, comparativamente com a actividade ALP do controlo. Os alunos compreenderam que apenas o cálculo da actividade específica permitiu comparar diferenças de actividade enzimática em cada tratamento.

Os estudantes puderam assim concluir que a presença de vanádio sob a forma de metavanadato de amónio inibiu o crescimento de leveduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, por observação qualitativa e pelo conteúdo proteico, bem como, pela diminuição da actividade específica fosfatase alcalina, um marcador de proliferação celular.

No que diz respeito aos objectivos traçados para este trabalho, que incluíam aproximar os alunos do ensino secundário a uma abordagem molecular sobre os efeitos dos metais no ambiente e em particular sobre os seres vivos, confirma-se que a aproximação experimental aqui delineada foi adequada, embora alguns passos mereçam uma afinação posterior. Os alunos ficaram familiarizados com os fundamentos das técnicas e a execução experimental utilizados para promover e avaliar o crescimento microbiano, na sedimentação celular por centrifugação, na homogeneização e fraccionamento celular para a obtenção de uma fracção enriquecida em fosfatase alcalina, bem como, com procedimentos analíticos como medidas de absorvência para quantificar proteínas e enzimas na fracção obtida, não esquecendo o tratamento computacional dos resultados.

As informações obtidas a partir do inquérito de opinião confirmam o elevado grau de satisfação com que a grande maioria dos discentes participaram voluntariamente nesta acção, revelando que alunos do 10º e 12º ano da Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal, sentiram que concluíram com sucesso e satisfação os objectivos previamente traçados para esta acção.

O planeamento prévio desta acção, em particular, o texto de apoio que constituiu o seu suporte teórico, bem como, a montagem e aferição dos métodos que vieram posteriormente a ser desenvolvidos com os alunos, facilitou a escolha adequada das estratégias a adoptar incluindo a calendarização de cada sessão e respectiva distribuição dos alunos, factores que conduziram ao sucesso da execução experimental e da concretização dos objectivos definidos previamente.

Parte II - Texto de apoio

1. Propriedades físico-químicas do vanádio.

1.1. Importância dos metais de transição nos sistemas vivos.

Os metais de transição são fundamentais para o funcionamento de proteínas, ao participarem em reacções de oxidação-redução e na estabilização da estrutura proteica (Kaplan, 1999).

1.2. Localização do vanádio na tabela periódica.

O vanádio é o elemento de número atómico 23. Localiza-se no grupo 5 e no 4º período da tabela periódica, apresentando como configuração electrónica [Ar] 3d³4s². É um metal de transição, apresentando orbitais d em preenchimento. Este elemento apresenta como isótopos estáveis, o V⁵⁰ e o V⁵¹. O primeiro com uma abundância relativa de 0,24% e o segundo de 99,76%. Existe ainda na natureza, vestígios dos isótopos V⁴⁸, V⁴⁹ e V⁵² (Chasteen, 1983).

1.3. Valência e estados de oxidação.

O vanádio apresenta no estado fundamental, 3 electrões em 3 orbitais d. É um elemento d³, apresentando predominantemente os estados de oxidação +2, +3, +4 e +5 (Russel, 1982). Neste estudo, o metavanadato de amónio é o composto utilizado como fonte de vanádio, no qual o estado de oxidação deste elemento é de +5. Por sua vez, o metavanadato corresponde ao tetrâmero cíclico do anião vanadato (Jean, 2008; Crans, 1994).

1.4. Actividade biológica do vanádio.

As células apresentam vários mecanismos que permitem em meio extra-celular a solubilização de metais de transição, como o vanádio, e a sua consequente transferência para o citoplasma (Kaplan, 1999).

Os estados de oxidação +4 e +5 no vanádio, são os que se encontram mais frequentemente presentes nas actividades biológicas, interconvertendo-se um no outro (Bosque, 1993).

A actividade biológica do vanádio deve-se sobretudo às semelhanças electrónicas e estruturais do vanadato com o ortofosfato e aos locais de ligação de fosfatos nos enzimas (Plass, 1999).

Este elemento inibe a biossíntese do colesterol e de triacilgliceróis (Fridkin, 2003). Por outro lado, induz a biossíntese de glicogénio no homem (Fridkin, 2003) e a

mineralização dos dentes e ossos em animais (Chasteen, 1983). Tem também um papel na contracção do músculo cardiovascular (Chasteen, 1983).

Existem trabalhos desenvolvidos que colocam a possibilidade do vanádio vir a ser utilizado no desenvolvimento de compostos com actividade espermicida e anti-HIV (D'Cruz, 2003) assim como no tratamento do cancro do cólon (Banerjee, 2003). Há igualmente outros realizados no âmbito dos efeitos farmacológicos de compostos de vanádio com propriedades insulino-miméticas (Fichtl, 2003).

1.5. Toxicidade do vanádio pentavalente.

Apesar da importância dos metais de transição nos sistemas vivos, as células também necessitam de se proteger simultaneamente dos seus efeitos nocivos, associados à sua versatilidade em participarem em reacções de oxidação-redução. A partir destas, podem ser geradas espécies reactivas de oxigénio (ROS) se a concentração intra-celular de metais de transição não fôr devidamente regulada no meio citoplasmático (Kaplan, 1999).

A toxicidade celular do vanádio está pois associada ao *stress* oxidativo, gerado pela formação de ROS (Bruzzone, 2000; Castranova, 2000). Por sua vez, a partir deste composto e de metais de transição como o vanádio, formam-se radicais hidroxilo (HO^\cdot) os quais são bastante reactivos e tóxicos (Storey, 1996; Thannickal & Fanburg, 2000).

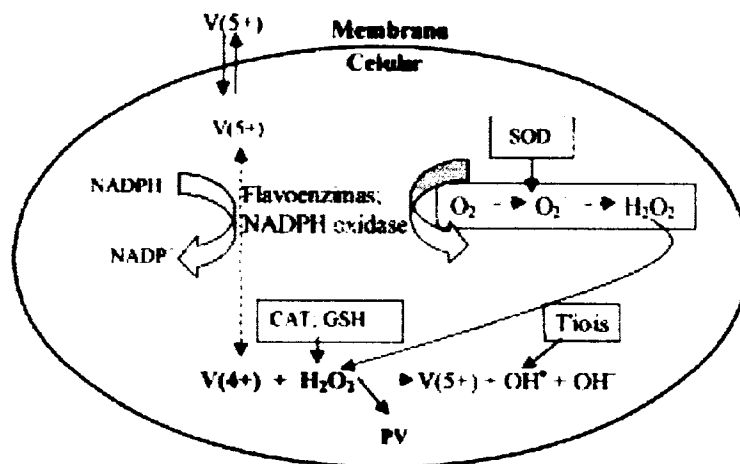


Figura 2.1. Proposta de um mecanismo de acção do vanadato. CAT, catalase; PV, peroxovanadato; SOD, superóxido dismutase. *Adaptado de Capella et al (2002).*

O vanadato comporta-se também como indutor indirecto de genes associados à angiogénese e ao crescimento tumoral, via ROS (Ding, 2002).

1.6. Vanádio e ambiente.

O vanádio é um elemento amplamente distribuído no meio ambiente, apresentando na crosta terrestre uma concentração aproximada de 150 ppm (Rodríguez-Mercado, 2006; Pyrzynska & Wierzbicki, 2004; Zoroddu, 1996). As actividades humanas têm contribuído para o seu aumento apreciável, sendo inclusivamente um poluente na periferia de alguns complexos industriais (Penuelas, 2002).

2. Propriedades físico-químicas do metavanadato de amónio.

2.1. Reactividade do metavanadato de amónio.

O metavanadato é um tetrâmero cíclico que apresenta o vanadato (VO_3^-) como monómero, predominando em soluções mais concentradas deste anião, na gama de concentração situada entre μM e mM (Crans, 1994). O vanádio deverá entrar na célula através de um sistema de transporte aniónico utilizado pelo fosfato, sendo posteriormente reduzido por agentes redutores (Zaporowska & Scibior, 1998). A passagem do estado de oxidação +5 para +4 poderá constituir um mecanismo natural de diminuição da sua toxicidade. Além do mais, a incorporação de vanádio (IV) na albumina e em proteínas como a ferritina ou a transferrina, torna quase irreversível a sua posterior oxidação (Winter, 2009, Baran, 1998).

2.2. Aplicações do metavanadato de amónio na vida quotidiana.

O metavanadato de amónio é utilizado em alguns métodos analíticos, como por exemplo na espectrometria de absorção molecular e para doseamento do peróxido de hidrogénio (Oliveira, 2001).

2.3. Toxicidade do metavanadato de amónio nos sistemas vivos.

O metavanadato de amónio, composto onde o vanádio se encontra na forma pentavalente (V^{5+}), apresenta uma elevada toxicidade, traduzida em muitos casos pela inibição de enzimas como ATP_{ases} (Adachi, 2000); Hamada, 1998; Puri, 1998; Cantley, 1978).

3. Caracterização biológica de *S. cerevisiae*.

3.1. Classificação taxonômica.

A sequenciação genética da *Saccharomyces cerevisiae* foi publicada em 1996 (Goffeau, 1996). A levedura em questão pertence ao reino Fungi (Tatusova, 1999), cuja classificação taxonômica segundo a base de dados NCBI é apresentada no quadro 1.1 (NCBI, <http://www.ncbi.org>, 2009).

Quadro 1.1-Classificação taxonômica de *S. cerevisiae* segundo a NCBI.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Classificação científica	
Domínio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Sub-filo	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordem	<i>Saccharomycetales</i>
Família	<i>Saccharomycetaceae</i>
Gênero	<i>Saccharomyces</i>
Espécie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

3.2. Importância da *S. cerevisiae* como modelo biológico.

A *Saccharomyces cerevisiae*, como ser unicelular eucariota, não-patogênico (GRAS), apresenta um rápido crescimento, facilidade na obtenção e isolamento, sistema genético bem definido e versatilidade para transformação genética (Gietz, 2002). Pode ser utilizada como um importante modelo para investigação de vias metabólicas e seus aspectos reguladores ao nível da expressão genética ou após a tradução (Lima & Mota, 2003; Grant, 2001; Costa & Moradas - Ferreira, 2001; Cooper, 2000 e Buschini, 2003), assim como, no estudo de mecanismos associados à utilização de metais de transição a partir do meio extracelular (Yu, 2009; Kaplan, 1999).

Estudos relativos a uma melhor compreensão do comportamento de proteínas presentes nas membranas dos eucariotas superiores, têm sido desenvolvidos a partir do mecanismo de transporte da fosfatase alcalina (ALP) para o vacúolo da *Saccharomyces cerevisiae* (Woolford, 1986).

Esta levedura tem ainda importância nas pesquisas da localização subcelular de proteínas (Ross-Macdonald, 1999), mapas bidimensionais de proteínas (Garrels, 1997;

Blomberg, 2002), determinação da actividade enzimática (Martzen, 1999), assim como em estudos de interacção proteína-proteína (Ito, 2000).

4. Soluções tampão

4.1. Equação de Henderson – Hasselbalch.

Um tampão é uma solução que contém um ácido (HA) e a sua base conjugada (A^-) em concentrações aproximadamente iguais, sofrendo apenas pequena variação de pH quando são adicionados catiões H_3O^+ ou aniões HO^- (Russell, 1982).

A partir da constante de acidez $K_a = \frac{|H_3O^+| \times |A^-|}{|HA|}$ e da definição de pH, dada pela

equação $pH = -\log|H_3O^+|$, deduz-se a equação de *Henderson – Hasselbalch*, a qual é

descrita por $pH = pK_a - \log \frac{|HA|}{|A^-|}$ (Abriata, 2009; Russell, 1982).

4.2. Aplicações.

As soluções tampão são utilizadas quando se pretende manter o pH estável dentro de certos limites (Russell, 1982), como acontece nos meios reaccionais que simulam os processos que ocorrem nos organismos vivos, os quais são geralmente sensíveis a variações de pH (Girault, 2007; Russell, 1982).

5. Lei de Beer – Lambert.

5.1. Enunciado e equação matemática.

A partir da técnica de absorção molecular, obtém-se uma medida de unidade óptica designada por absorvência que pode ser convertida em concentração. Idealmente e de acordo com a lei de Beer – Lambert, existe uma relação linear entre a absorvência e a concentração de uma solução diluída (Catarino, 2002).

Ao incidir perpendicularmente sobre uma amostra absorvente no estado líquido, um feixe de radiação monocromática, de potência P_0 , esta é subtraída para P devido à absorção ou dispersão que ocorre no meio com espessura b dessa amostra de concentração c (Gonçalves, 1990).

A absorvência é definida pelo logaritmo do quociente da potência da radiação incidente (P_0) pela potência da radiação transmitida (P), ou seja por $A = \log \frac{P_0}{P}$ (Skoog, 2007).

Obtém-se a equação de Beer – Lambert traduzida pela expressão matemática $A = \epsilon bc$ (Skoog, 2007), onde ϵ corresponde ao coeficiente de absorvidade, que se designa por coeficiente de absorvidade molar no caso de a unidade de concentração ser expressa em molaridade (Gonçalves, 1990).

A lei de Beer – Lambert mostra que para uma dada solução e a um dado comprimento de onda, a absorvência é para a mesma espessura, directamente proporcional à concentração da espécie absorvente e proporcional à espessura quando se fixa a concentração (Gonçalves, 1990).

5.2. Limites de aplicabilidade.

Na prática, mesmo num intervalo pequeno de concentração, verificam-se condições de inaplicabilidade da lei de Beer – Lambert, pelo que a não linearidade constitui a regra e não a excepção (Limbeek, 1986). Os desvios da proporcionalidade podem resultar da existência de uma reacção química que faça variar a concentração da espécie absorvente em solução, visto que a concentração c dessa espécie absorvente livre, no equilíbrio, não ter de ser igual ou proporcional à sua concentração total ou analítica (Skoog, 2007).

5.3. Erros sistemáticos e erros acidentais.

Qualquer medida experimental está sujeita a erro, o qual é a diferença absoluta entre o valor tomado como verdadeiro e o valor medido (Pombeiro, 1983).

Os erros sistemáticos são constantes se o seu efeito não varia de medida para medida. Podem ser devidos a problemas instrumentais, decorrentes da incorrecta calibração de aparelhos como a utilização de um branco mal preparado, por exemplo. Podem dever-se ainda à presença de impurezas (Pombeiro, 1983).

Por sua vez, os erros acidentais são fortuitos ou indeterminados. Devem-se geralmente a variações, ao acaso, de causas que podem não ser exactamente conhecidas ou controladas (Romesburg, 2009; Pombeiro, 1983).

6. Cinética enzimática.

6.1. Introdução à cinética química.

A cinética química tem como principal objectivo estabelecer a lei de velocidade para uma determinada reacção química e propor uma hipótese mecanística que interprete esse processo (Russell, 1982).

A velocidade de uma reacção é uma medida da rapidez com que um reagente é consumido ou um produto é formado. Uma equação de velocidade descreve uma relação matemática do tipo: $v = kc$, onde v designa velocidade; c , concentração para uma determinada temperatura, variando o coeficiente k com esta última grandeza. A ordem de uma reacção é por sua vez a soma dos expoentes que afectam a concentração na equação de velocidade (Russell, 1982).

O método da velocidade inicial é um dos métodos úteis para estabelecer equações de velocidade de reacções e por consequência, de determinação de ordens de reacção (Kotz, 2009; Russell, 1982).

6.2. Equação Michaelis - Menten.

De acordo com Bailey (1977), a velocidade de uma reacção enzimática pode ser descrita a partir da equação de Michaelis – Menten, ou seja

$$v = v_{\max} \times \frac{|S|}{K_m + |S|}$$

onde o K_m corresponde à concentração de substrato (S) para a qual a velocidade de reacção (v) corresponde a metade da velocidade máxima (v_{\max}) (Bisswanger, 2008).

6.3. Factores que afectam a actividade enzimática.

Um dos factores que afecta a actividade enzimática, é o pH do meio. A sua variação em vacúolos tem permitido uma melhor compreensão sobre a forma como este factor afecta a actividade enzimática num contexto metabólico (Banta, 1988).

Outro factor é a temperatura. A partir de baixas temperaturas, a actividade enzimática aumenta com a elevação da mesma. Contudo, o contrário ocorre a elevadas temperaturas, por motivos associados com a desnaturação da maior parte dos enzimas (Bailey, 1977).

A actividade enzimática depende também da relação que existe entre a concentração de substrato na célula e o valor de K_m do enzima (Moore, 2008; McGilvery, 1977).

6.4. Caracterização estrutural e funcional da fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma glico-proteína transmembranar, apresentando um domínio em cada lado da bicamada lipídica e um domínio citoplasmático com elevada afinidade com proteases (Klionsky, 1989).

O domínio citoplasmático, com uma vasta região de natureza hidrófila, apresenta na sua extremidade o grupo amina e diversos aminoácidos de carácter básico seguidos por uma sequência de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos de natureza hidrófoba e uma nova sequência mais pequena de aminoácidos de carácter básico, o que pode pressupor o seu carácter transmembranar (Eisenberg, 1984).

Este enzima apresenta ainda duas ligações a oligossacarídeos a partir do grupo amina (Onishi, 1979).

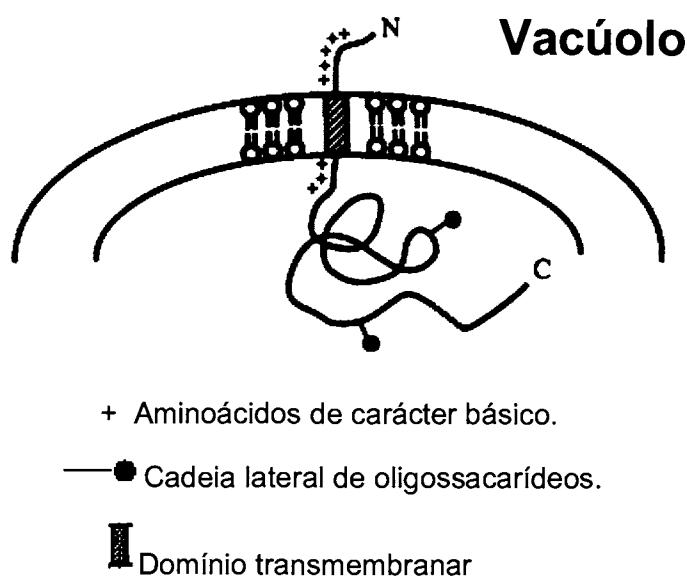


Figura 2.2. Fosfatase alcalina na *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Klionsky (1989).

Estudos recentes identificaram proteínas transportadoras transmembranares, como as Erv26p e Svp26p, associadas ao transporte da fosfatase alcalina (ALP) a partir do retículo endoplasmático (Bue, 2009; Bue, 2006; Inadome, 2005).

6.5. Importância biológica da fosfatase alcalina.

A fosfatase alcalina é um enzima associado ao crescimento. No caso particular do homem, é sintetizada pelo fígado, ossos e placenta, sendo libertada na corrente sanguínea durante o crescimento ósseo, gravidez ou perante uma lesão (Akiskal, 2007). Este enzima está também associado a processos de diferenciação, sinalização celular, meiose, mitose, apoptose, migração celular, defesa imunológica e regulação em várias espécies. Na *Saccharomyces cerevisiae*, a fosfatase alcalina participa conjuntamente com outros enzimas em mecanismos associados à obtenção e utilização do grupo fosfato P_i (Fernandes, 2008).

Referências bibliográficas

- Abriata, L.; Cassina, A.; Tórtora, V.; Marín, M.; Sousa, J.; Castro, L.; Vila, A.; Radi, R. (2009) Protein Structure and Folding. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**:17-26.
- Adachi, A. e Asai, K. (2000) Subacute vanadium toxicity in rats. *J. Health Sci.*, **6**:503- 508.
- Akiskal, H. S. (2007) Manual Merck, Merck & CO, USA.
- Alonso, L. (2000) A construção social do currículo: uma abordagem ecológica e prático. *Revista de Educação*, **10**:1.
- Araújo, S. (2008) *Contributos para uma educação para a cidadania: professores e alunos em contexto intercultural*. Editorial do Ministério da Educação. Lisboa.
- Bailey, J.E. e Ollis D.F. (1977) *Biochemical Engineering Fundamentals*. Tokio: Mc Graw-Hill Kogakusha.
- Banerjee, P.; Chakraborty, T.; Chatterjee, M.; Hemalatha, P.; Mahendrakumar, C.; Kanna, P. (2003): Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 dimethyl hydrazine. *World Journal Gastroenterol*, **9**:1020-1027.
- Banta, L.M.; Robinson, J.S.; Klionsky, D. J.; Emr, S.D. (1988) *J. Cell Biol*, **107**:1369-1383.
- Baran, E. (1998). Vanadium detoxification in: "Vanadium in the Environment", Part 2: "Health effects", 318-345, J. Nriagu, John Wiley & Sons.
- Bisswanger, H. (2008) *Enzyme Kinetics – Principles and Methods*. 2ª edição. Hans Bisswanger. Weinheim.
- Blomberg, A. (2002) Use of two-dimensional gels in yeast proteomics. *Methods Enzymol*. **350**, 559.
- Boscolo, P.; Carmignani, M.; Mascioocco, L.; Preziosi, P.; Volpe, A. (1991) Cardiovascular system and kidney as specific targets of chronic exposure to vanadato in the rat: functional and morphological findings. *Arch. Toxicol*. **14**:124-127.
- Bosqe, M.; Corbella, J.; Domingo, J.; Luna, M. (1993) Prevention by tiron (sodium-4,5-dihydroxybenzene-1,3-dissulfonate) of vanadato-induced development toxicity in mice. *Teratology*, **48**: 133-138.
- Bruzzone, L.; Cortizo, A.; Etcheverry, S.; Molinuevo, S. (2000) A possible role of oxidative stress in vanadium-induced cytotoxicity in the MC₃T₃E₁ osteoblast and UMR₁₀₆ osteosarcoma cell lines. *Toxicology*, **147**:89-99.
- Buschini, A.; Poli, P. and Rossi, C. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* as a eukariotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*. **18**:25-36.
- Cantley, L.; Cantley L. & Josephson L. (1978) A characterization of vanadate interactions with the (Na, K)-ATPase mechanistic and regulatory implications, *J. Biol. Chem.*, **253**:7361-7372.
- Capella, L.; Capella, M; Gefé, M.; Lopes, A.; Mitidieri, A.; Rumjanek, V.; Silva, E. (2002) Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **406**:65-72.
- Cardoso A. C. e Gil V. M. S. (1983) *Fundamentos da estrutura e propriedades da matéria*. Coimbra: Livraria Almedina.
- Castranova, V.; Ding, M.; Huang, C.; Jui, G.; Leonard, S.; Rojanasakul, Y.; Vallyathan, V.; Shi, X. (2000) Vanadium-induced Nuclear Factor of Activated T Cells Activation through Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**:22397-22403.
- Catarino, S.; Curvelo - Garcia, A.S.; Sousa R. B. (2008) *Elementos contaminantes do vinho*, in *Ciência Técnica Vitivinícola*, **23**:3 – 19.
- Catarino, S.; Curvelo Garcia, A.S.; Sousa, R. B. (2002) *Determination of zinc in wine by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Validation of the analytical method*, in *Ciência Técnica Vitivinícola*, **17**:15-26.
- Chasteen, N. (1983) The biochemistry of vanadium. *Structure and Bonding*, 105-138, Springer Berlin, Heidelberg.
- Cooper, J. M. (2000) *The cell: A molecular approach*. Sunderland, London, GB.

- Costa, V. & Moradas – Ferreira. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicin.* **22**:217-246.
- Crans, D. (1994) Aqueous chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies. *Comments Inorganic Chemistry*, **16**:1-33.
- D’Cruz, O.J.; Dong, Y; Uckun, F. M. (2003) Potent dual anti-HIV and spermicidal activities of a novel oxovanadium (V) complexes with thiourea non-nucleoside inhibitors of HIV -1 reverse transcriptase. *Biochemistry Biophys. Res. Commun.* **302**:253-264.
- Ding, M.; Gao, N.; Jiang, B; Leonard, S.; Liu, K; Shi, X.; Zhang, Z; Zheng, J. (2002) Vanadate-induced Expression of Hypoxia-inducible Factor 1 α and Vascular Endothelial.
- Domingos, A.M.; Neves, I.P. & Galhardo, L. (1987) Uma forma de estruturar o ensino e a aprendizagem, Livros Horizonte, LDA, Lisboa.
- Eisenberg, D. (1984). *Annu. Rev. Biochem.*, **53**:595-623.
- Elliot, J. (1995) El papel del profesorado en el desarrollo curricular: una cuestión irresuelta en los intentos ingleses de reforma curricular. *Volver a Pensar la Educación. Prácticas y Discursos Educativos (Vol. II)*, 245-272.
- Fernandes, J.; Amorim, R.; Azevedo, I; Martins, M. (2008) In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate medium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **41**:41-46.
- Ferreira, W. F. C.; Sousa, J. C. F. (1998) Microbiologia (Vol. 1). Edições Técnicas Lda, Lisboa.
- Fichtl, B.; Heinemann, G.; Vogt, W. (2003) Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **55**:241-245.
- Fridkin, M.; Gefel, D.; Goldwasser, I.; Mironchik, M.; Shechter, Y. (2003) Histotic perspective and recent developments on the insuli-like actions of vanadium: toward developing vanadium-based drugs for diabetes, *Coordination Chemistry Reviews*, **237**:3-11.
- Garrels J. I.; McLaughlin C. S.; Warner J. R.; Futcher B.; Latter G. I.; Kpbayashi R.; Schwender B.; Volpe T.; Anderson D. S.; Mesquita-Fuentes R.; Payne W. E. (1997). Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis.* **18**:1347.
- Gietz, R. D.; Woods, R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate / single-stranded carrier DNA / polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**:87.
- Girault, H. (2007). Électrochimie physique et analytique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.
- Goffeau, A. (1996) Life of 6000 genes. *Science*, **274**:546-567.
- Gómez, G.; Ruiz, M.; Sáiz, M. (2007) *Evaluación de Competências en un Contexto de Aprendizaje Mixto.* 39-43. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz.
- Gonçalves, M, L. (1990) Métodos Instrumentais para Análise de Soluções, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Grant, C. M. (2001) Role of glutathione / glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology.* **39**:533-541.
- Hamada, T. (1998) High vanadium content in Mount Fuji groundwater and its relevance to the ancientbiosphere. In J. Nriagu, (Ed.), *Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and biochemistry*, 97–123, John Wiley & Sons, NewYork.
- Harris W. R.; Carrano C. J. (1984) Binding of vanadate to human serum transferrin. *Journal of inorganic biochemistry.* **22**:201-218.
- Healy, W. B. (1973) Nutritional aspects of soil ingestion by grazing animals. In G. W. Butler & R. W. Bailey (Ed.), *Chemistry and biochemistry of herbage*, Academic Press, New York.
- Huang C.; Zhang Z. e Shi X. (2000) Vanadate induces p.53 transactivation trough hydrogen peroxide and causes apoptosis. *Journal of biological chemistry* **259**:13273 – 13281.
- Ito T.; Tashiro K.; Muta S.; Ozawa R.; Chiba T.; Nishizawa M.; Yamamoto K.; Kuhara S.; Sakaki Y. (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive

- system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**:1143.
- Jean, Y. (2008). *Molecular Orbitals of Transition Metal Chemistry*. Oxford University Press, Oxford
- Johnson, L.M.; Bankaitis, V.A.; Emr, S.D. (1987) *Cell*. **48**:875-885.
- Kaplan, J. e Radisky, D. (1999) Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane, *Journal of Biological Chemistry*. **274**:4481-4484.
- Klionsky, D. J.; Emr, S. D. (1989) Membrane protein sorting: biosynthesis, transport and processing of yeast vacuolar alkaline phosphatase. *The EMBO Journal*. **8**:2241-2250.
- Kotz, J.; Treichel, P.; Townsend, J. (2009) Chemistry and Chemical Reactivity. 670-759. Thomson Books / School. Belmont.
- Ldberg, D. M. e Spooner R. J. (1977) Clinical and methodological studies on serum glutathione reductase activity, in A. Burlina, L. Galzigna (eds), *Clinical Enzymology Symposia*, Vol. 1, Piccin Medical Books, pp. 259 – 271.
- Lenney, J.; Matile, P.; Wiemken, A.; Schellenberg, M. and Meyer, J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**:1378 – 1383.
- Lima, N. & Mota, M. (2003). *Biocologia: Fundamentos e aplicações*. LIDEL Edições Técnicas Lda, Lisboa.
- Limbek, B. E.; Rowe C. J. (1986) Curve Correction in Atomic Spectrometry. *Varian Atomic Absorption*, AA – 58.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, J.; Farr, A. L. e Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Madigan; Martinko; Parker . (2004) *Microbiologia de Brock*, 10ª ed., EDITORA, São Paulo.
- Mamane, Y.; Pirrone, N. (1998) Vanadium in the atmosphere. In J. Nriagu, (Ed.), *Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and biochemistry*, 37–71, John Wiley & Sons New York.
- Martzen M. R.; McCrouths S. M.; Spinelli S. L.; Torres F. M.; Field, S.; Grayhack, E. J.; Phizicky, E. M. (1999) A biochemical genomics approach for identification genes by the activity of their products. *Science*. **286**:1153.
- McGilvery, R. (1977) *Conceptos Bioquímicos*, Editorial Reverté, Barcelona.
- Moore, J.; Langley, R. (2008) *Biochemistry for dummies*. Willey Publishing Inc. Hoboken.
- Novak, J. D. (1993) Human constructivism: A unification of psychological and epistemological phenomena in meaning making. *International Journal of Personal Construct Psychology*, **6**:167-193.
- Oliveira, M. C.; Nogueira, R. F. P.; Neto, W. F.; Jardim, J. J. R.; Rohdeweder. (2001) *Química Nova*. **24**:188.
- Onishi, H. R.; Tkacz, J. S.; Lampen, J. O. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**:11943-11952.
- Penuelas, J. & Filella, I. (2002) Metal pollution in Spanish terrestrial ecosystems during twentieth century. *Chemosphere*. **46**:501-505.
- Plass, W. (1999) Phosphate and vanadato in biological systems: chemical relatives or more? *Angew. Chemistry*. **38**:909-912.
- Pombeiro, A. J. (1983) *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*, Fundação Calouste Gulbenkian, Porto.
- Puri, S.; Dubey, R. K.; Gupta, M. K.; Puri, B. K. (1998) Differential pulse polarographic determination of trace amounts o vanadium and molybdenum in varoius standard alloys and environmental samples after preconcentration of their morpholine-carbodthioates on microcrystalline naphtalene on morpholine-4-dithiocarbamate cetyltrimethyl ammonium bromide naphtalene adsorbent, *Talanta*. **46**:655-664.
- Pyrzynska, K. & Wierzbicki, T. (2004) Determination of vanadium species in environmental samples. *Talanta*., **64**:823-830.
- Reis, P. (2008). *A escola e as controvérsias sociocientíficas: Perspectivas de alunos e professores*. Lisboa: Escolar Editora.
- Rodríguez-Mercado, J. J. & Altamirano-Lozano, M. A. (2006) Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **22**:173-184.
- Romesburg, H. (2009) *Best Research Practices – How to gain reliable knowledge*. Lulu Enterprises, Inc. Morrisville.

- Ross-MacDonald, P.; Sheehan, A. F.; Friddle, C.; Roeder G. S.; Snyder M. (1999) Transposon mutagenesis for the analysis of protein production, function, and localization. *Meth. Enzymo.* **303**:512.
- Russel, J.B. (1982) Química Geral, McGraw-Hill, S. Paulo.
- Sadler, T. D. (2004) Informal reasoning regarding socioscientific issues: A critical review of research. *Journal of Research in Science Teaching*, **41**:513-536.
- Silva, M.; Basso. (2004) Efeitos do cádmio sobre as leveduras PE-2 e IZ-1904, *Ciência e Tecnologia Alimentar.*, Campinas. **24**:016-022.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Stanley, R. C. (2007) Principles of Instrumental Analysis, 6th edition, Cole Publishing, Belmont.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1997). Biometry. W. H. Freeman, New York.
- Stevens, T.; Esmon, B.; Schelkman, R. (1982) *Cell*. **30**:439-448.
- Storey, K. B. (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**:1715-1733.
- Tatusova, T. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Ostell, J. A. (1999) Complete genomes in www Entrez: data representation and analysis. *Bioinformatics*. **15**:536-543.
- Thannickal, V.; Fanburg, B. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**:1005-1028.
- Tietze, F. (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total oxidized glutathione. *Analytical Chemistry*. **27**:502 – 520.
- Tran, L. T.; Miki, T.; Kamakura, M.; Izawa, S.; Tsujimoto, Y.; Maybe, S.; Inone, Y. Phosphate dehydrogenase by lipid hydroperoxide in *Hansenula mraki*. *Journal of fermentation and bioengineering*. **80**:606 – 609.
- Wiemken, A.; Schellenberg, M. and Urech, K. (1979) *Arch. Microbiol.* **123**:23 – 35.
- Willsky, G. R. (1990). Vanadium in the biosphere. In N. D. Chasteen. (Ed.), *Vanadium in Biological Systems*, 1-24, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Winter, J. M.; Moore, B. (2009) Exploring the Chemistry and Biology of Vanadium – dependent Haloperoxidases. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**:18577-18581.
- Wooford, C. A.; Daniels, L. G.; Park, F. J.; Jones, E. W.; van Arsdell, J. N.; Innis, M. A. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**:2500-2510.
- Yu, Q.; Kuzmiak, H.; Zou, Y.; Olsen, L. (2009) Transcription Chromatin, and Epigenetics. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**:740-750.
- Zaporowska, H.; Scibior, A. (1998) Vanadium and its significance in animal cell metabolism. In: "Vanadium in the Environment". Part 2: "Health effects", 121-133, J. Nriagu, John Wiley & Sons.
- Zeidler, D. L. (2003) *The role of moral reasoning on socioscientific issues and discourse in science education*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, NY.
- Zoroddu, M. A. ; Fruianu, M. ; Dallochio, R. & Masiat, A. (1996) Electron paramagnetic resonance studies and effects of vanadium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*. **9**:91-101.

Webgrafia

<http://bcortez.files.wordpress.com> (acedido a 16 de Outubro de 2008).

<http://www.ig.usp.br> (acedido a 16 de Outubro de 2006).

<http://www.livronline.com> (acedido a 17 de Outubro de 2008).

ANEXOS

I. Segurança laboratorial

Agar

Fabricante: MERCK.

Guardar em local fresco e húmido. Em caso de ser guardado a uma temperatura superior a 30°C, manter em local iluminado. Recomendado para trabalho bacteriológico de rotina. Temperatura de gelificação não superior a 40°C.

Carbonato de sódio monohidratado

Fabricante: MERCK.

Irritante. Irritante aos olhos, sistema respiratório e pele. No caso de contacto com os olhos, lavar abundantemente com água e seguir aconselhamento médico.

Extracto de levedura

Fabricante: Sigma.

Guardar à temperatura ambiente. Não utilizar para actividades domésticas ou outros usos.

Hidróxido de sódio

Fabricante: MERCK.

Provoca queimaduras graves. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. Usar luvas e equipamento protector para a vista.

Metavanadato de amónio

Fabricante: MERCK.

Tóxico por inalação e em contacto com a pele. Irritante em contacto com os olhos e sistema respiratório. Risco de causar sérios danos aos olhos. Em contacto por acidente ou em caso de má disposição, seguir um aconselhamento médico. Em caso de contacto com os olhos lavar abundantemente com água e seguir um acompanhamento médico. Após o contacto com a pele, lavar imediatamente com água.

Sulfato de cobre (II) pentahidratado

Fabricante: Panreac.

Nocivo por ingestão. Irritante para os olhos e pele. Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático. Não respirar as poeiras. Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos. Evitar a libertação para o ambiente.

Tris (hidroximetil) aminometano

Fabricante: MERCK.

Propriedades e toxicidade ainda não completamente determinadas. Irritante aos olhos, sistema respiratório e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar abundantemente com água e seguir aconselhamento médico.

II. Cálculos

2.1. Preparação de soluções aquosas de metavanadato de amónio

200 mL de uma solução aquosa de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) com uma concentração molar de 25 mM:

$$M(\text{NH}_4\text{VO}_3) = 116,978 \text{ g/mol}$$

$$n = 25 \times 10^{-3} \text{ mol / dm}^3 \times 0,2 \text{ dm}^3 = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

$$m(\text{NH}_4\text{VO}_3) = 0,58 \text{ g.}$$

200 mL de uma solução aquosa de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) com uma concentração molar de 75 mM:

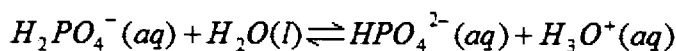
$$\frac{75\text{mM}}{25\text{mM}} = 3 \quad m(\text{NH}_4\text{VO}_3) = 3 \times 0,58\text{g} = 1,74\text{g.}$$

2.2. Preparação de solução tampão fosfato 10 mM, pH=7

$$pK_{a2} = 7,21$$

$$M(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 119,9770 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 141,9589 \text{ g/mol}$$



$$K_{a2} = \frac{|\text{HPO}_4^{2-}| \times |\text{H}_3\text{O}^+|}{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|}$$

$$pK_{a2} = -\log \frac{|\text{HPO}_4^{2-}|}{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|} + \text{pH}$$

$$\text{pH} = pK_{a2} + \log \frac{|\text{HPO}_4^{2-}|}{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|}$$

Por substituição:

$$7,00 = 7,21 + \log \frac{|HPO_4^{2-}|}{|H_2PO_4^-|}$$

$$-0,21 = \log \frac{|HPO_4^{2-}|}{|H_2PO_4^-|}$$

$$10^{-0,21} = \frac{|HPO_4^{2-}|}{|H_2PO_4^-|}$$

$$0,62 = \frac{|HPO_4^{2-}|}{|H_2PO_4^-|}$$

Para a preparação de solução tampão fosfato 10 mM, pH = 7:

$$|HPO_4^{2-}| + |H_2PO_4^-| = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol} / \text{dm}^3$$

e

$$|HPO_4^{2-}| = 0,62 \times |H_2PO_4^-|$$

Por resolução do sistema de equações, obtém-se:

$$|H_2PO_4^-| = 6,2 \times 10^{-3} \text{ mol} / \text{dm}^3$$

e

$$|HPO_4^{2-}| = 3,8 \times 10^{-3} \text{ mol} / \text{dm}^3$$

Para a preparação de 1 dm³ de tampão fosfato:

$$m(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 6,2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \times 1 \text{ dm}^3 \times 119,9770 \text{ g/mol} = 0,7439 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,8 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \times 1 \text{ dm}^3 \times 141,9589 \text{ g/mol} = 0,5394 \text{ g}$$

III. Materiais pedagógicos, propostas de actividades experimentais apresentadas aos alunos, avaliação de competências, critérios de correcção e resultados da avaliação.

3.1. Preparação de meios YPD líquido e dos meios sólidos YPD e YPD-V (a)

Materiais pedagógicos

Diapositivos de PowerPoint apresentados

YPD

O YPD (Yeast peptone dextrose) é um meio rico em nutrientes necessários ao crescimento de leveduras como a *Sacharomyces cerevisiae*.



O YPD contém

- Água;
- Extracto de levedura;
- Peptona;
- Glucose, como fonte de carbono.

Deverá ser preparado:

- Um meio de cultura YPD em meio líquido, de menor volume, para activar uma amostra de leveduras inativas.

- Um meio de cultura YPD em meio líquido, de maior volume, para proporcionar o crescimento das leveduras até um bom estado de desenvolvimento;



- Meios de cultura em meio sólido apresentando diferentes concentrações de metavanadato de amónio, para ensaios de exposição ao vanádio.

Meio de cultura sólido controlo sem vanádio.



Meio YPD sólido

Meio YPD sólido, além dos componentes do meio YPD líquido, contém ainda ágar.





Meio YPD sólido

Vantagens:

- Permitir a identificação e o isolamento de culturas;



Proposta de actividade experimental apresentada aos alunos

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins		
Actividade Experimental	Física e Química A - 10ºE	16/04/2009	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Como preparar meios de culturas para crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ e avaliar o efeito do vanádio no seu crescimento?

Nomes:

Introdução

A cultura em laboratório de leveduras obriga à preparação de um meio que deve incluir uma fonte de carbono, uma fonte de azoto, sais minerais e água. O meio rico YPD é adequado para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, sendo composto por água, glucose como fonte de carbono, peptona como fonte de azoto e extracto de levedura que contém sais minerais.

Por esse motivo, iremos preparar um erlenmeyer com 20 mL de meio rico para multiplicação da levedura a partir da qual recolheremos uma alíquota que iremos utilizar para inocular 100 mL de outro meio líquido YPD que utilizaremos para acompanhar a cultura de levedura.



Para os ensaios de exposição ao vanádio iremos preparar meios sólido YPD (controlo) e YPD-V, os quais, além da composição semelhante à do meio líquido, contêm ainda agar e metavanadato de amónio (YPD-V), respectivamente, uma matriz coloidal que se mantém no estado sólido no intervalo de temperatura utilizado vulgarmente para cultura de microorganismos.

Objectivos

- Preparar dois meios líquidos YPD de 20 e 100 mL, para crescimento da levedura;
- Preparar meios sólidos YPD-V com diferente concentração de metavanadato de amónio (25 e 75 mM), para os ensaios de exposição ao vanádio.

Procedimento experimental

Substâncias e Soluções:

- Água destilada;
- Extracto de levedura;
- Glucose;
- Metavanadato de amónio;
- Peptona.

Equipamento

- Balança semi-analítica.

Material:

- Bico de Bunsen;
- Caixas de Petri esterilizadas (9);
- Erlenmeyer de 100 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Esguicho de água;
- Espátulas (3);
- Frasco graduado;
- Vidros de relógio (6).

Actividade experimental:

Planear com a turma, a escolha do meio de cultura a preparar por cada um dos grupos e registar.

Meio de cultura	Grupo
20 mL de meio de cultura YPD líquido.	
100 mL de meio de cultura YPD líquido.	
Meio de cultura YPD sólido	
Meio de cultura YPD-V sólido com a menor concentração de metavanadato de amónio planeada pela turma (____ mM).	
Meio de cultura YPD-V sólido com a concentração mais elevada de metavanadato de amónio planeada pela turma (____ mM).	

Preparação dos meios de cultura YPD líquido para crescimento da levedura***- Preparação do primeiro meio de cultura YPD líquido***

Num erlenmeyer de 100 mL, misturar 0,20 g de extracto de levedura, 0,40 g de peptona, 0,40 g de glucose e 20 mL de água bidestilada. Agitar e tapar com rolha de algodão hidrófobo e gase.

- Preparação do segundo meio de cultura YPD líquido

Num erlenmeyer de 250 mL, misturar extracto de levedura, peptona, glucose e água, de modo a ter-se 100 mL de um meio de cultura semelhante ao anterior.

Discutir e registar:

Massa de extracto de levedura _____

Massa de peptona _____

Massa de glucose _____

Volume de água _____

Nota: Estas duas culturas podem ser preparadas separadamente a partir de dois grupos de trabalho, que deverão trocar informação entre si.

Preparação de culturas de levedura YPD sólido***- Preparação de YPD***

Para o ensaio controlo (sem metavanadato de amónio), misturar num frasco graduado autoclavável de 500 mL, 2,00 g de extracto de levedura, 4,00 g de peptona, 4,00 g de glucose, 4,00 g de agar e 200 mL de água bidestilada.

- Preparação dos meios de cultura YPD-V sólido com diferentes concentrações molares de metavanadato de amónio

Preparar 200 mL de dois meios YPD-V sólido com diferentes concentrações de metavanadato de amónio.

- Esterilização dos meios de cultura

Após a preparação dos meios líquidos YPD e sólidos YPD e YPD-V, esterilizar em autoclave durante 20 min, 120 °C.

-Distribuição dos meios de cultura sólidos

Em três caixas de Petri, distribuir à chama o YPD sólido.

Repetir o mesmo procedimento com os outros dois meios de cultura YPD-V preparados com concentração diferente de metavanadato de amónio.

Discutir, calcular e registar:

No caso de ter ficado planeado, o grupo deve preparar um meio sólido YPD-V contendo metavanadato de amónio:

Concentração molar de metavanadato de amónio pretendida _____

Quantidade de metavanadato de amónio necessária _____

Massa molar do metavanadato de amónio (NH_4VO_3) _____

Massa necessária de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) _____

Massa a medir tendo em conta a balança apresentada _____.

Questões pós-laboratoriais a desenvolver:



a) Indicar, justificando, a massa de cada componente, que é necessário medir para preparar 100 mL do meio líquido YPD.

b) Indicar, justificando, a massa de metavanadato de amónio que é necessário medir, para preparar a cultura YPD em meio sólido, planeada pela turma, com a menor concentração desse composto.

c) Indicar, justificando, a massa de metavanadato de amónio que é necessário medir, para preparar a cultura YPD em meio sólido, planeada pela turma, com a concentração mais elevada desse composto, a partir da massa obtida na alínea anterior.

Avaliação de competências

Questionário apresentado antes e após o desenvolvimento da actividade experimental

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avaliação de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Física e Química A - 10ºE	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Número: _____

Nome: _____

Preparação de meios de cultura**I**

Lê um extracto do seguinte artigo:

Água do mar (I. *freshwater*)

A densidade da água do mar varia com a salinidade e a temperatura. A densidade média à superfície é de 1,025 g/mL, variando entre 1,020 g/mL e 1,029 g/mL, mais densa do que a água doce (1,000 g/mL). Em profundidade, devido à temperatura e à pressão, a densidade da água é tendencialmente maior, atingindo valores de 1,050 g/mL ou superiores. A temperatura de congelação da água do mar decresce em função da salinidade sendo de -2 °C para a salinidade 35 ‰.

(in, Revista de Gestão Costeira Integrada para Países de Língua Portuguesa)

Para tornar potável 1000 L de água do mar, que massa de sais é necessário precipitar?



II

100 mL de uma solução aquosa, contém 2,05 g de cloreto de sódio.

Que massa de cloreto de sódio é necessário medir para preparar 250 mL de uma nova solução aquosa, com a mesma concentração da anterior

FIM

Cr terios de correc o

	Universidade de �vora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avalia�o de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Crêterios de correc�o	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Prepara o de meios de cultura**I**

$1,025 \text{ g/mL} - 1,000 \text{ g/mL} = \dots\dots\dots$	45 %
$= 0,025 \text{ g/mL} \dots\dots\dots$	5 %
$1000 \text{ L} = 10^6 \text{ mL} \dots\dots\dots$	5 %
$m = 0,025 \text{ g/mL} \times 10^6 \text{ mL} \dots\dots\dots$	40 %
$m = 2,5 \times 10^4 \text{ g} \dots\dots\dots$	5 %
	100 %

II

$m = 2,05\text{g} \times \frac{250 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \dots\dots\dots$	95 %
$m = 5,13\text{g} \dots\dots\dots$	5 %
	100 %

Resultados da avalia o

N�	I		II	
	Antes	Após	Antes	Após
1	0	0	0	100
2	0	100	100	100
3	0	100	100	100
4	0	0	0	100
5	0	100	100	94
6	0	47,5	47,5	100
7	0	0	0	99
8	100	100	100	100
9	0	0	0	95
10	5	0	100	100
11	95	0	0	100
12	0	0	100	100
13	0	0	100	100
14	0	0	0	95
15	0	0	95	99
16	0	0	100	100
17	0	0	0	100
18	100	0	0	95
19	0	0	0	100
20	0	0	0	100
21	0	0	0	100

3.2. Inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez (b)

Materiais pedagógicos

Diapositivos de PowerPoint apresentados

Preparação de uma cultura da levedura de *Sacharomyces cerevisiae*


Etapas:

- Esterilizar o meio líquido YPD em autoclave ,durante 20 min a 120°C;
- Inocular uma pequena amostra da cultura isolada de levedura em 20 mL de meio líquidoYPD ;
- Colocar em banho-maria, com temperatura controlada durante 16 h, à temperatura de 28°C;
- Pipetar alíquota 2 mL da suspensão obtida para inocular 100 mL de meio YPD líquido;

Preparação de uma cultura de levedura *Sacharomyces cerevisiae*

Etapa:

- Monitorizar a turbidez $_{640nm}$ da cultura mantida em banho – maria com temperatura controlada a 28°C até atingir 0,8.



Absorção/Dispersão da Luz

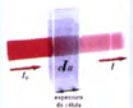
Quando a luz incide numa solução, uma parte é absorvida enquanto que a restante pode atravessá-la ou desviar-se em maior ou menor grau (dispersão);



São atribuídos valores numéricos para comparar essas diferentes intensidades luminosas;

Absorção/Dispersão da Luz

São atribuídos valores numéricos para comparar essas diferentes intensidades luminosas




Esses valores dependem da intensidade da luz incidente (I_0) e da intensidade da luz transmitida (I)

A relação entre essas duas grandezas, tratada matematicamente, depende da concentração do soluto ou da fase dispersa.

Absorção/Dispersão da Luz

Para se ter uma maior sensibilidade, deve ser utilizada uma radiação incidente que seja bem absorvida ou dispersa pela solução;

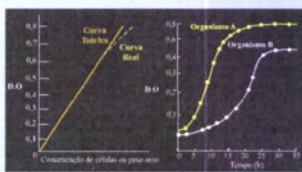
Na região do visível, a radiação incidente apresenta uma cor que é complementar à do material.



Exemplo:
Se um material absorve o azul, reflecte o seu complementar que é o amarelo.

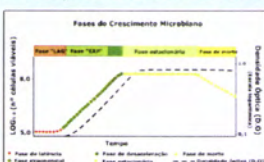
Absorção/dispersão da Luz

O acompanhamento do crescimento de uma população de levedura pode assim ser acompanhado por medidas da luz dispersa pelo meio, quantificando a sua turbidez.



Crescimento de *Sacharomyces cerevisiae*



Os microrganismos apresentam várias fases de crescimento.



Um a população deve ser estudada a meio da sua fase exponencial de crescimento (Fase EXP).

Na levedura em estudo, esse ponto apresenta um a turbidez próxima de 0,8.

Proposta de actividade experimental apresentada aos alunos

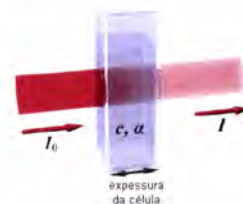
	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins		
Actividade Experimental	Física e Química A - 10ºE	17/04/2009	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Preparação de cultura de leveduras (*S. cerevisiae* UE-ME₃) em meio líquido

Nomes:

Introdução

Para se preparar uma cultura da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, dever-se-á primeiro proporcionar a adaptação de uma pequena população inactiva a um meio de cultura YPD, o qual é uma fonte de nutrientes. Como a turbidez do meio de cultura é proporcional à sua concentração, é possível acompanhar o crescimento de uma população em meio YPD líquido, inoculando uma alíquota de uma outra cultura em novo meio YPD. O valor de turbidez_{640nm} próximo de 0,8 indica que a população se encontra em fase exponencial média de crescimento, instante adequado para ser utilizada em estudos posteriores.



A cultura deve, em ambas as etapas, ser mantida a 28 °C com agitação orbital na ordem das 150 rpm.

Procedimento Experimental**Substâncias e Soluções:**

- Cultura isolada de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃;
- Meios líquidos YPD.

Material:

- Ansa de cromo-níquel;
- Autoclave;
- Termómetro
- Banho-maria com agitação e temperatura controlada por termostato.

Equipamento

- Espectrómetro de absorção molecular

Actividade Experimental:

Actividade a desenvolver no primeiro dia (16 de Abril):

- Após a preparação dos meios líquidos YPD, esterilizar em autoclave durante 20 min, 120 °C.
- Após arrefecimento inocular com uma ansa de cromo 20 mL de meio líquido YPD e colocá-lo em banho maria a 28 °C por termóstato, durante 16 h.

Actividade a desenvolver no segundo dia (17 de Abril):

- Utilizar 2 mL da suspensão celular obtida anteriormente para inocular 100 mL meio líquido YPD e colocar em banho-maria a 28 °C.
- Monitorizar, em intervalos de 1 h, no espectrómetro de absorção molecular, a turbidez da cultura a 640nm, até atingir um valor próximo de 0,8, registando os resultados.

Observações e resultados experimentais

Indicar:

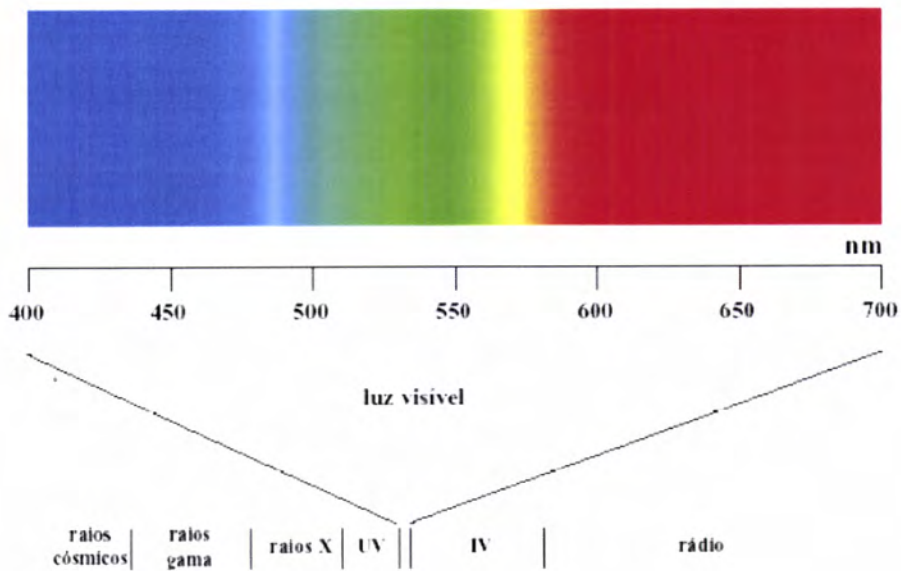
Turbidez final _____

Tempo de crescimento _____

Aspecto da população

Questões pós-laboratoriais a desenvolver:

Qual o λ seleccionado para monitorizar o crescimento da população?





b) Indicar o motivo da escolha da radiação com a cor seleccionada.



FIM

Avaliação de competências

Questionário apresentado antes e após o desenvolvimento da actividade experimental

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avaliação de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Física e Química A -10ºE	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Número: _____

Nome: _____

Preparação de cultura de leveduras (*S. cerevisiae* UE-ME₃) em meio líquido

I

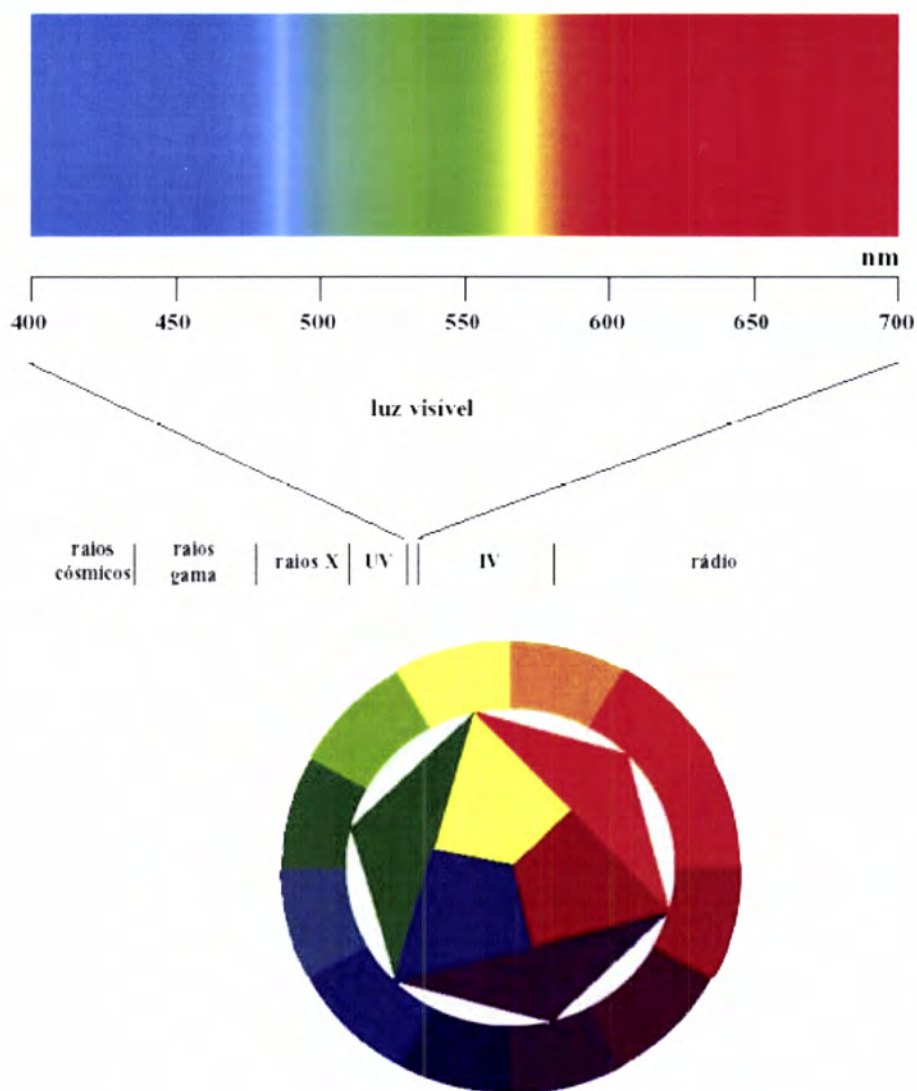
A descoberta do cobre remonta a tempos pré-históricos, pois a sua exploração mineira já é feita há mais de 6000 anos. Juntamente com o ouro e o ferro, o cobre era já utilizado pelas civilizações ancestrais, tal como a egípcia. Os principais depósitos de cobre da Antiguidade estavam localizados no Sinai, na Síria, no Afeganistão, em Chipre, na Macedónia, na Ibéria e na Europa Central. As principais minas europeias da Era do Bronze estavam localizadas na Áustria, Alemanha, França, Espanha, Portugal, Grécia e Tirol.

A indústria de cobre actual depara com numerosos problemas, pelo facto de este elemento ser tecnologicamente superado por outros materiais como o alumínio, o aço ou os plásticos.



In: <http://nautilus.fis.uc.pt>



A partir da extracção de cobre existente numa peça antiga, obteve-se uma solução aquosa de cor azul devido à presença de catiões cobre (II). Pretende-se desse modo determinar a concentração de cobre na solução, de modo a fazer-se uma estimativa da massa desse elemento existente na peça.



Indica um possível comprimento de onda de uma radiação que deveria ser utilizada num espectrofotómetro de absorção molecular para determinar a concentração de cobre na solução obtida. Apresenta o teu raciocínio.

FIM

Cr terios de correc o

	Universidade de �vora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avalia�o de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Crêterios de correc�o	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Prepara o de cultura de leveduras (*S. cerevisiae* UE-ME₃) em meio l quido

580-680 nm	50 %
porque corresponde ao comprimento de onda do amarelo	10 %
que � preferencialmente absorvido pela soluço	20 %
porque � a cor complementar do azul.	20 %
	100 %

Resultados da avalia o

N�	Antes	Após
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	100
6	0	0
7	45	90
8	0	0
9	0	0
10	0	90
11	0	30
12	0	80
13	0	0
14	0	30
15	0	0
16	0	30
17	0	0
18	0	100
19	20	100
20	0	0
21	0	30

3.3. Inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido da determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos após incubação a 28 °C durante 72 h (c)

Materiais pedagógicos

Diapositivos de PowerPoint apresentados

Efeito do vanádio no crescimento da *Sacharomyces cerevisiae*

O meio de cultura sólido YPD e YPD-V com diferentes concentrações de vanádio após esterilização em autoclave deverão ser distribuído em placas de Petri estéreis.

A inoculação do meio de cultura YPD sólido utilizando cultura levedura em meio YPD líquido deve fazer-se junto a uma chama, ambiente estéril.



Efeito do vanádio no crescimento da *Sacharomyces cerevisiae*

Para estudar o efeito do vanádio no crescimento da *Sacharomyces cerevisiae*, deve-se submeter várias populações desta levedura a diferentes concentrações desse elemento;

O vanádio, por sua vez, é adicionado através do metavanadato de amónio (NH_4VO_3).



No controlo, uma das populações deve desenvolver-se na ausência de vanádio.



Efeito do vanádio no crescimento da *Sacharomyces cerevisiae*



Cada população de levedura em crescimento deve ser colocada na estufa a uma temperatura constante, durante 72 horas.

Planifica-se para este estudo que a temperatura seleccionada seja de 28°C.

Proposta de actividade experimental apresentada aos alunos

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins		
Actividade Experimental	Física e Química A - 10ºE	17/04/2009 20/04/2009	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ em meios sólido com concentração diferente de metavanadato de amónio, a 28°C durante 72 h

Nomes:

Introdução



Para estudar o efeito do vanádio no crescimento da *S. cerevisiae* UE-ME₃, deve-se submeter esta levedura a níveis de exposição diferentes deste elemento, comparando o seu crescimento com o que ocorre na ausência de vanádio.

A inoculação do meio de cultura YPD sólido utilizando uma cultura, em meio YPD líquido, de levedura em fase exponencial média deve fazer-se junto a uma chama, de modo a manter um ambiente estéril.



Procedimento Experimental

Substâncias e Soluções:

- Meio de cultura YPD líquido com levedura em fase exponencial média;
- Meios de cultura YPD sólido em caixas de Petri (previamente preparado);
- Meios de cultura YPD-V sólido em caixas de Petri com diferentes concentrações de metavanadato de amónio (previamente preparado).

Material:

- Ansa de cromo-níquel;
- Bico de Bunsen;
- Micropipeta;
- Pontas de micropipeta esterilizadas.

Descrição da Experiência e protocolo:

Junto à chama emitida pelo Bico de Bunsen, inocular cada um dos meios de cultura em caixa de Petri com 50 μL /caixa de cultura em meio líquido de levedura em fase exponencial média (trabalho anterior).

Observações e resultados experimentais

Indicar:

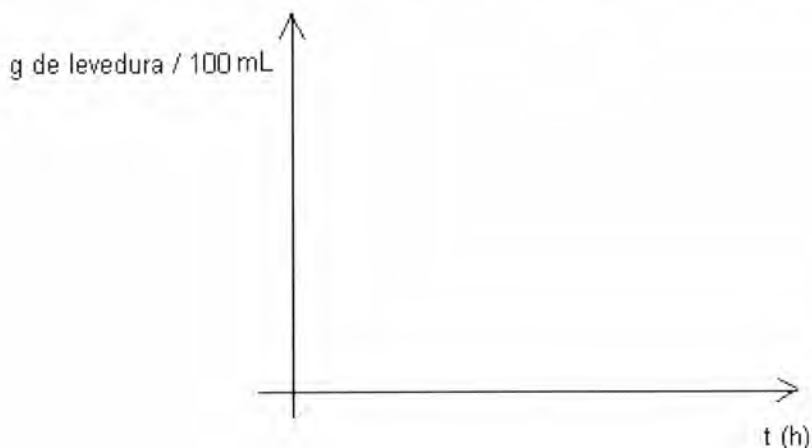
O meio em que o crescimento de levedura é superior.

O meio em que o crescimento da levedura é inferior.

Relação entre crescimento de levedura e concentração de vanádio.



Questões pós laboratoriais a desenvolver:

Faça um esboço de um gráfico que represente ao longo do tempo, a massa de levedura obtida por cada 100 mL de meio de cultura, na ausência de vanádio e com uma concentração deste elemento de $25 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.



Avaliação de competências

Questionário apresentado antes e após o desenvolvimento da actividade experimental

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avaliação de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Física e Química A - 10ºE	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Número: _____

Nome: _____

Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em meios com diferentes concentrações de metavanadato de amónio, à temperatura de 28°C durante 72 h

I

Uma equipa de investigadores estudou o efeito do cádmio (Cd) no crescimento de uma levedura, tendo obtido os resultados indicados no gráfico 1, que indica ao longo do tempo, a massa de levedura por cada 100 mL de meio de cultura.

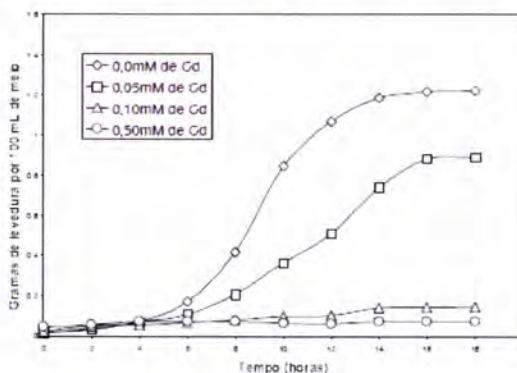




Gráfico 1

Como é que a equipa de investigadores planificou a actividade experimental?

II

O cádmio é um elemento que facilita ou dificulta o crescimento da levedura? Justifica.

Cr terios de correc o

	Universidade de �vora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avalia�o de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Crêterios de correc�o	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meios com diferentes concentra es de metavanadato de am nio,   temperatura de 28 C durante 72 h

I

A equipa de investigadores submeteu o crescimento de levedura a diferentes concentra es de c dmio 50%

e mediu a concentra o em massa de levedura ao longo do tempo 50%

100%

II

O c dmio   um elemento que dificulta (inibe) o crescimento da levedura 50%

porque a sua massa por unidade de volume que   obtida, diminui   medida que a concentra o de c dmio aumenta 50%

100%

Nota:

- Se o aluno mencionar massa ou quantidade de c dmio, em detrimento de concentra o, descontar 20%.
- Se o aluno mencionar quantidade de levedura, em detrimento de massa de levedura, descontar 20%.

Resultados da avaliação

Nº	I		II	
	Antes	Após	Antes	Após
1	10	40	60	60
2	30	30	70	80
3	0	60	70	80
4	0	40	60	80
5	40	50	80	80
6	20	30	60	60
7	20	40	60	60
8	30	30	70	80
9	30	30	80	80
10	40	40	60	60
11	40	40	80	80
12	10	40	80	80
13	10	40	60	60
14	0	0	60	60
15	0	0	70	80
16	0	20	50	50
17	40	40	80	80
18	10	10	60	60
19	10	10	60	60
20	20	0	50	60
21	0	0	60	60
22	30	45	50	80

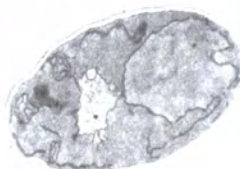
3.4. Extracção do enzima ALP de leveduras crescidas em diferentes meios sólidos (d)

Materiais pedagógicos

Diapositivos de PowerPoint apresentados

Extracção da fosfatase alcalina (ALP)

É necessário romper a parede da *Sacharomyces cerevisiae* para obter a fosfatase alcalina (ALP) do citoplasma de levedura.





Extracção da fosfatase alcalina (ALP)

Etapas:

- Decantar o sobrenadante e tamponizar este a pH 7;
- Lisar as células com ultra-sons;
- Centrifugar durante 30 min, 12000 g, a 4°C.



Proposta de actividade experimental apresentada aos alunos

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins		
Actividade Experimental	Física e Química A - 10ºE	20/04/2009	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Extracção do enzima ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em diferentes meios**Nomes:**

Introdução

Avaliar o(s) efeito(s) metabólico(s) do vanádio em *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, obriga à determinação de actividades enzimáticas presentes em diferentes compartimentos celulares. A obtenção de extractos enzimáticos com enzimas citoplasmáticos obriga ao rompimento da parede e da membrana citoplasmática da levedura para facilitar a recolha do citoplasma. Um desses enzimas denomina-se fosfatase alcalina (ALP). A obtenção destes extractos enzimáticos far-se-á a partir de leveduras crescidas em diferentes condições de exposição ao vanádio, para determinar como este elemento pode afectar essa actividade enzimática. O rompimento da parede celular da levedura será realizado recorrendo a um desintegrador de ultra-sons, em condições onde não ocorra a desnaturação da fosfatase alcalina, solução tampão e temperatura de 4 °C.

Procedimento Experimental

Substâncias e Soluções:

- Leveduras crescidas durante 72 h a 28 °C em meio sólido YPD;
- Leveduras crescidas durante 72 h a 28 °C em meios sólido YPD-V com metavanadato de amônio na concentração de 25 ou 75 mM.

Material:

- Copos de 25 mL (3);
- Espátulas (3);
- Micropipeta;
- Microtubos de 1,5 mL;
- Proveta de 10 mL;
- Tubos de centrifuga.

Equipamento:

- Desintegrador de ultra-sons;
- Supercentrífuga.

Descrição da Experiência:

Recolher as células crescidas em cada tratamento para tubos de centrifuga, utilizando uma espátula. Adicionar em cada conjunto de três caixas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, 8 mL de água destilada.

Centrifugar durante 10 min à força centrífuga de 2500 g.

Após a centrifugação descartar o sobrenadante (líquido) e resuspender o sedimento (células) em 8 mL de água recorrendo a um agitador tipo vórtex.

Repetir a lavagem 2x.

Resuspender o último sedimento (células após lavagem) em 5 mL de tampão fosfato 10 mM, pH = 7 e transferir separadamente cada uma das suspensões para um copo de 25 mL mantido a 4°C.

Lisar as células com o homogeneizador de ultra-sons (3x5 min a 10 Hz).

Repetir o procedimento para os outros dois meios.

Transferir para um tubo de centrifuga cada uma das culturas e centrifugar durante 30 min, a 12000 g e à temperatura de 4 °C.

Colocar separadamente cada um dos sobrenadantes em microtubo de 1,5 mL.

Guardar a -20 °C.

Observações e resultados experimentais

Indicar:

O aspecto da mistura após a primeira centrifugação.

O aspecto da mistura após a desintegração.

O aspecto da mistura no final da centrifugação.



Questões pós laboratoriais a desenvolver:

O que farias com uma amostra de sangue, para separar o plasma dos glóbulos e plaquetas?

Seguidamente, como poderias separar as plaquetas dos glóbulos do sangue?

Avaliação de competências

Questionário apresentado antes e após o desenvolvimento da actividade experimental

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avaliação de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Física e Química A - 10ºE	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Extracção do enzima ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em diferentes meios

Número: _____

Nome: _____

O sangue proveniente de uma unidade de sangue total vai para o laboratório de Produção de componentes para ser centrifugado e separado com vista à sua rentabilização e uso eficaz na terapêutica dos doentes, de acordo com a deficiência que apresentam. O sistema de sacos múltiplos para onde o sangue é colhido permite que todo o processo seja feito em circuito fechado e estéril, garantindo assim a segurança e qualidade máximas na obtenção dos componentes sanguíneos. O sistema de sacos contém anticoagulante para evitar que o sangue coagule e substâncias nutrientes para prolongar a viabilidade dos eritrócitos durante o armazenamento.

Numa primeira centrifugação, o sangue total vai ser separado obtendo-se um concentrado eritrocitário e um plasma. Numa segunda centrifugação, e de acordo com as necessidades do serviço, podemos obter um concentrado plaquetário e um plasma fresco, ou um crioprecipitado e um plasma sobrenadante do crioprecipitado.



(in Instituto Português do Sangue, IP)

Pensa e responde:

Como obter a partir de uma amostra de sangue, um concentrado plaquetário de acordo com as necessidades do serviço hospitalar? Justifica de uma forma razoavelmente completa.

FIM

Cr terios de correc o

	Universidade de �vora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avalia�o de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Crêterios de correc�o	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Extrac o do enzima ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em diferentes meios

I

Centrifugar a amostra de sangue a uma velocidade mais baixa	25%
para obter um concentrado de eritrócitos e um plasma	10%
Decantar	20%
Centrifugar o plasma a uma velocidade mais elevada	25%
para obter um concentrado plaquetário desejável e um novo plasma	10%
Decantar	10%

100%

Resultados da avalia o**Extrac o do enzima ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em diferentes meios**

N�	Antes	Após
1	35	35
2	15	25
3	35	25
4	55	70
5	35	35
6	35	35
7	0	35
8	0	35

3.5. Determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry (e)

Materiais pedagógicos

Diapositivos de PowerPoint apresentados

Método de Lowry

O método de Lowry permite determinar por espectrometria, o conteúdo proteico.

Reagentes:

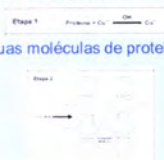
- Reagente de Lowry;
- Folin – Ciocalteu.



Método de Lowry

O reagente de Lowry contém uma solução alcalina com cátions cobre (II) que são reduzidos a cobre (I) pelas proteínas.

Por sua vez, o cobre (I) forma com duas moléculas de proteína, um complexo solúvel em água.



O Folin – Ciocalteu contém ácido molibdico – tungsténico que é reduzido pelo enzima, formando-se um complexo cobre-proteína de cor azul.

O complexo obtido tem um máximo de absorvência a 720 nm.

Curva de calibração

Etapas:

- Preparar soluções padrão com diferente concentração do complexo de cor azul, cobre – proteína, utilizando-se como proteína, a albumina de soro bovino (BSA);





- Num espectrómetro seleccionar o comprimento de onda de 720 nm.
- Medir a absorvência de cada solução;
- Por regressão linear, obter a melhor recta que se ajusta aos pontos experimentais.

Determinação do conteúdo proteico

Após a construção da curva de calibração, determina-se o conteúdo proteico em cada amostra, a partir da sua absorvência ao comprimento de onda de 720 nm.

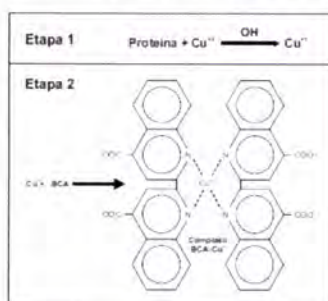


Proposta de actividade experimental apresentada aos alunos

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins		
Actividade Experimental	Física e Química A - 10ºE	2/05/2009	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry**Nomes:****Introdução**

O método de Lowry permite a determinação por espectrometria de absorção molecular, de baixas concentrações de proteínas. Utiliza o reagente de Lowry e o de Folin – Ciocalteu. O reagente de Lowry contém uma solução alcalina com catiões cobre (II). Na presença de proteína, estes em meio alcalino são reduzidos a cobre (I).



Por sua vez, o ácido molibdicó–tungsténico presente no reagente de Folin–Ciocalteu forma em meio alcalino um complexo solúvel com duas moléculas de proteína, formando-se um complexo cobre-proteína de cor azul com um máximo de absorvência a 720 nm.

Para a construção da curva de calibração, utiliza-se como padrão albumina de soro bovina (BSA).

Se a curva de calibração apresenta um valor próximo de 1, pode-se afirmar que há uma correlação entre a absorvência da solução e a sua concentração.

Por outro lado, se o valor da ordenada na origem da melhor recta que se ajusta aos valores experimentais estiver afastado do zero, significa que ocorreram erros sistemáticos, os quais poderão dever-se a problemas na preparação do branco.

Procedimento Experimental

Substâncias e Soluções:

- BSA (albumina do soro bovino) a $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Solução F – Método de Lowry);
- Carbonato de sódio a 2% (p/V) em hidróxido de sódio 0,1M (Solução A – Método de Lowry);
- Folin-Ciocalteau (Solução D – Método de Lowry);
- Solução aquosa de NaOH (0,5 M) (Solução E – Método de Lowry);
- Sulfato de cobre (II) (preparada a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Solução B – Método de Lowry);
- Tartarato de sódio e potássio 2% (p/V) (Solução C – Método de Lowry).

Material:

- Balão volumétrico de 50 mL;
- Esguicho;
- Pipetas;
- Suporte de tubos de ensaio;
- Tubos de ensaio.

Equipamento:

- Espectrômetro de absorção molecular;
- Vórtex.

Descrição da Experiência:

Preparação do reagente de Lowry

Medir e transferir para um balão volumétrico de 50 mL, um volume de 0,5 mL da solução B (Sulfato de cobre (II)) e 0,5 mL da solução C (Tartarato de sódio e potássio 2 % (p/V)) e por fim, adicionar solução A (Carbonato de sódio a 2 % (p/V) em hidróxido de sódio 0,1M) até perfazer o volume do balão.

Preparação do reagente de Folin

Preparar 10 mL do reagente de Folin, diluindo duas vezes a solução de Folin – Ciocalteau (Solução D – Método de Lowry) e agitar no vórtex.

Preparação das soluções de BSA

Em cada tubo de ensaio, diluir a solução de BSA inicial com a solução aquosa de hidróxido de sódio, de modo a se obter 1 mL de novas soluções de BSA com a concentração mássica indicada no quadro seguinte.

Tubo	Concentração mássica de BSA ($\mu\text{g/mL}$)
1	0
2	50
3	75
4	100
5	125
6	150
7	175
8	200

Vamos pensar, calcular e registar

Tubo	Concentração mássica de BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de BSA (mL) (500 $\mu\text{g/mL}$)	Volume de NaOH (mL) (0,5M)
1	0		
2	50		
3	75		
4	100		
5	125		
6	150		
7	175		
8	200		

No vórtex agitar cada mistura duas vezes e deixar em repouso durante 10 min.

Adicionar 0,50 mL de reagente de Folin a cada mistura, aguardar 30 min e para cada solução, ler a absorvência ao comprimento de onda mais adequado.

Vamos registar

Comprimento de onda a seleccionar _____

Absorvência de cada uma das amostras.

Questões pós-laboratoriais:

Utilizando o Excel, obter a curva de calibração e anexar.



Perante o coeficiente de correlação obtido, o que se pode concluir acerca da qualidade da curva de calibração?

Está-se perante algum erro acidental considerável? Justificar.

Está-se perante erros sistemáticos relevantes? Justificar.

Avaliação de competências

Questionário apresentado antes e após o desenvolvimento da actividade experimental

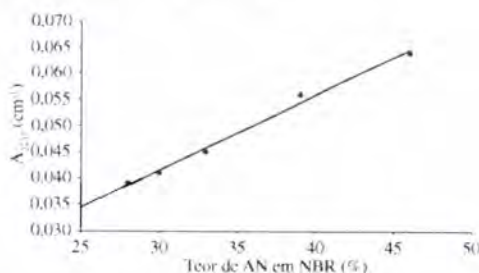
	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avaliação de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Física e Química A - 10ºE	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Número: _____

Nome: _____

Determinação do conteúdo em proteínas pelo método de Lowry

No ano de 2008, foi publicado na revista *Polímeros* de São Carlos, Brasil, um artigo científico intitulado “Avaliação da aplicabilidade de técnicas FT-IR de reflexão (UATR) e de transmissão para a determinação do teor de acrilonitrila (NA) em NBR”. Neste, é apresentada a curva de calibração obtida a partir da absorvência em função do teor de acrilonitrilo (AN) na borracha vulcanizada (NBR).



Relativamente à curva de calibração obtida, é apresentado o coeficiente de correlação (R) de 0,995 e a equação $y = 0,0049x + 0,0444$.

Contudo, numa parte do artigo pode ler-se:

“Mesmo a técnica tendo como característica, a falta de controlo de temperatura, foi feita uma tentativa para estimar a temperatura utilizada nos ensaios, conforme descrito no procedimento experimental. Foram realizados 5 ensaios e cada ensaio gerou aproximadamente 2400 pontos de temperatura, foram adoptadas para se calcular a média, apenas o valor de temperatura em 40 segundos de queima, pois este tempo representa o final da pirólise, os valores obtidos foram: 541, 615, 604, 597 e 592 °C, sendo a média dos valores, 590 °C.”

a) Está-se perante a existência de algum erro sistemático na metodologia utilizada?



Escreve uma parte do texto acima transcrito que possa fundamentar a tua resposta.

b) Supõe que uma empresa pretende comercializar borracha vulcanizada (NBR) com o teor de 30% em acrilonitrilo (AN) e que nas mesmas condições laboratoriais em que foi obtida a curva de calibração indicada, a absorvência medida numa amostra da borracha que está a ser fabricada pela empresa, foi de 0,050.

Qual a massa de acrilonitrilo (AN) que está a ser produzida em excesso por cada 100 kg de borracha vulcanizada (NBR)? Apresenta o teu raciocínio.

FIM

Cr terios de correc o

	Universidade de �vora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avalia�o de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Crêterios de correc�o	Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Determina o do conte do em prote nas pelo m todo de Lowry

a)

Est -se perante a exist ncia de erros sistem ticos 50%
 porque h  falta de controle da temperatura

ou

porque a curva de calibra o n o passa pela origem 50%

100%

b)

Teor de acrilonitrilo 30%

Percentagem de acrilonitrilo em excesso = 37% - 30% 35%

= 7% 5%

Massa de acrilonitrilo em excesso / 100 kg = 0,07 \times 100 25%

= 7 kg 5%

100%

Resultados da avalia o**Determina o do conte do em prote nas pelo m todo de Lowry**

Não	a)		b)	
	Antes	Após	Antes	Após
1	0	0	0	100
2	50	50	0	30
3	50	50	0	65
4	0	0	0	100

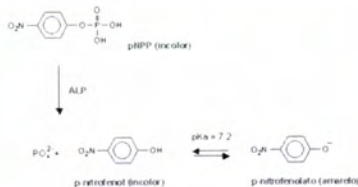
3.6. Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) (f)

Materiais pedagógicos

Diapositivos de PowerPoint apresentados

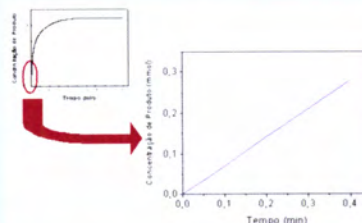
Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é um enzima que a pH 9 hidrolisa o p-nitrofenil fosfato, que é incolor, formando-se o anião p-nitrofenolato, de cor amarela.



Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

A velocidade inicial de formação do p-nitrofenolato é proporcional à actividade da enzima ALP.



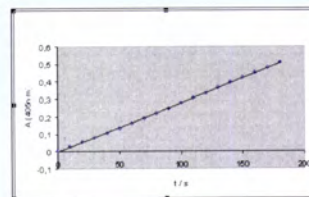
Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

Ao incidir-se no meio reaccional, uma radiação com um comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvência do p-nitrofenolato, pode-se monitorizar num espectrofotómetro a formação deste anião.



Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

Obtém-se a velocidade inicial de formação do p-nitrofenolato a partir do declive da melhor recta que ao ser obtida por regressão linear, se ajusta aos pontos experimentais.

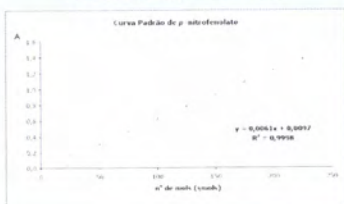


A velocidade inicial de formação do p – nitrofenolato (P) deve vir expressa em **U** mol P / min.

Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

É necessário recorrer à curva padrão do p - nitrofenolato para se proceder à conversão da absorvência deste anião em quantidade (mol).

Curva padrão do p - nitrofenolato





Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

Apartir de um tratamento matemático, a actividade enzimática (U) obtém-se a partir da relação:

$$U = m / 6,1$$

Sendo m o declive da recta obtida por regressão linear efectuada a partir da medição da absorvência ao longo do tempo, durante a formação do p - nitrofenolato.

Proposta de actividade experimental apresentada aos alunos

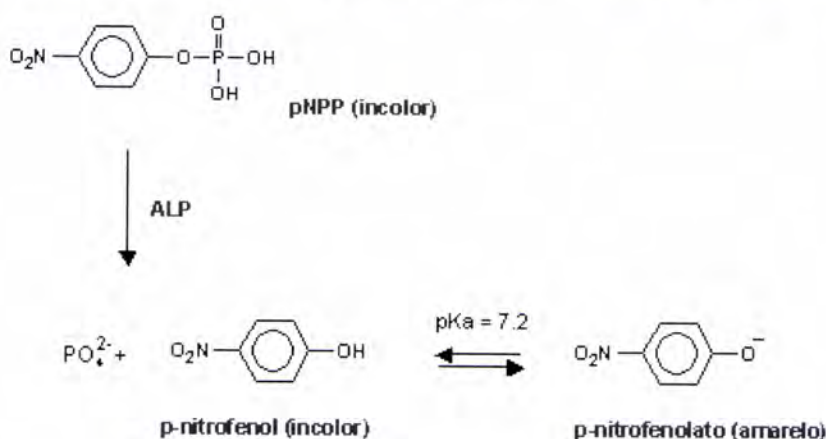
	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Actividade Experimental	Área de Projecto - 12ºA	09/05/2009 Prof. Rui Ferreira Prof. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Determinação da actividade da fosfatase alcalina (ALP) a partir da velocidade inicial da sua reacção com o para-nitrofenilfosfato (p-NPP)

Nomes:

Introdução

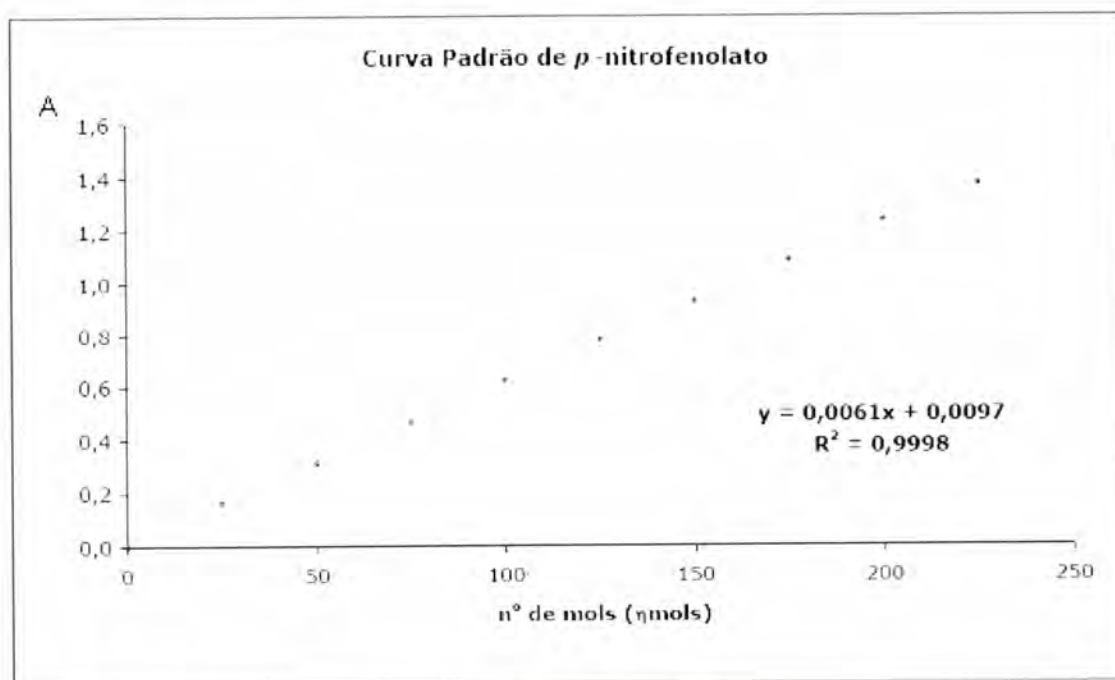
A fosfatase alcalina (ALP) é um enzima que a pH 9, hidrolisa o para-nitrofenilfosfato, que é incolor, formando-se o anião fosfato e o para-nitrofenol. A partir destes dois produtos de reacção, obtém-se o anião para-nitrofenolato, de cor amarela, cuja velocidade inicial de formação é proporcional à actividade da enzima.



Seleccionando a radiação incidente no meio reaccional, ao comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvência, pode-se monitorizar a formação do produto de reacção corado, e partir do declive da melhor recta que for obtida por regressão linear dos pontos experimentais, obtém-se a velocidade inicial da reacção química.

A partir desta, pode-se determinar a velocidade de formação do produto de reacção (P). Aconselha-se que esta venha expressa por $\mu\text{mol P / min}$.

Torna-se assim necessário recorrer à curva padrão do para-nitrofenolato para se proceder à conversão da absorvência deste anião em quantidade.



Obtém-se assim a relação, $v = ((m \times 60)/18,5)/m_p$

sendo v a actividade específica ALP e m o declive da melhor recta que se ajusta aos resultados experimentais obtidos a partir da medição da absorvência ao longo do tempo, relativos à formação do para-nitrofenolato.

Procedimento Experimental

Substâncias e Soluções:

- Água bidestilada;
- Extractos de enzima ALP;
- para-nitrofenilfosfato (p-NPP);
- Tampão pH 8,5 (tris – HCl 0,5 M).

Material:

- Esguicho;
- Micropipeta;
- Pontas de micropipeta.

Equipamento:

- Espectrofotómetro.

Descrição da Experiência:

Seleccionar, dentre as seguintes opções, o comprimento de onda adequado para monitorizar no visível, a absorvência durante a formação de para-nitrofenolato.

405 nm _____

505 nm _____

605 nm _____

705 nm _____

Proceder à monitorização da absorvência, utilizando-se uma termostatização de 37°C e um registo de 180 s.

Cada amostra de 700 µL deverá conter:

- 100 µL de tampão pH 8,5 (tris – HCl 0,5 M);
- 200 µL de p – NPP (para-nitrofenilfosfato);
- Água destilada;
- 100 µL de extracto contendo a enzima ALP.

Por sua vez, o branco não contém extracto.

Em relação às restantes amostras, adicionar o extracto na célula e colocar esta de imediato no espectrofotómetro.

Vamos pensar e registar:

Como preparar cada uma das amostras?

Branco

Amostras

Questões pós-laboratoriais a desenvolver:

a) Indicar os resultados experimentais obtidos para cada extracto e respectivos gráficos.

b) Avaliar a qualidade de cada curva (aproximação dos pontos experimentais de uma recta e passagem pela origem) e colocar como hipótese a existência de erros acidentais e/ou sistemáticos.



c) Indicar como varia a velocidade de libertação de fósforo inorgânico com o aumento da concentração de vanádio assimilado pela levedura.

Discutir e comentar:

Como é que o aumento de concentração de metavanadato de amónio num meio de cultura da levedura em estudo, afecta a actividade do enzima ALP?

Avaliação de competências

Questionário apresentado antes e após o desenvolvimento da actividade experimental

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avaliação de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Área de Projecto - 12ºA	Prof. Rui Ferreira Prof.ª Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Determinação da actividade da fosfatase alcalina (ALP) a partir da velocidade inicial da sua reacção com o para-nitrofenilfosfato (p-NPP)

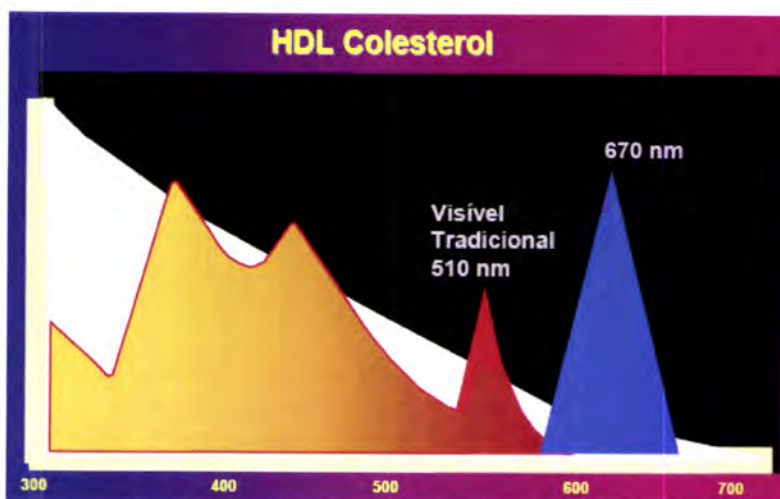
Número: _____

Nome: _____

Uma actividade física regular pode ajudar a diminuir os níveis de LDL-colesterol, o chamado "mau" colesterol e a aumentar os níveis de HDL-colesterol, o chamado "bom" colesterol. Deverá sempre consultar o seu médico antes de iniciar a prática de exercício. Não se preocupe, pois o começo será mais fácil do que julga.

Pfizer

Em relação ao chamado “bom colesterol”, o HDL – colesterol, indica-se na figura seguinte o seu espectro de absorvência.



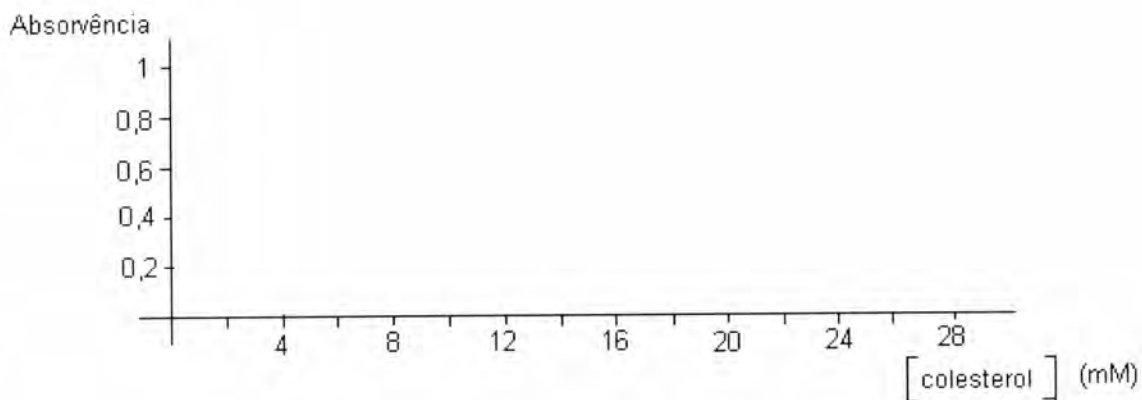
Preparou-se uma curva de calibração para o colesterol, cujos valores das absorvências constam no quadro anexo.

[Colesterol] mM	Absorvência
2.0	0.070
5.0	0.170
10.0	0.350
15.0	0.503
20.0	0.677
25.0	0.831

Por sua vez, uma amostra de sangue apresenta nas mesmas condições, uma absorvência de 0.200.



a) Para medir a concentração de colesterol-HDL, utilizando a espectrometria de absorção molecular, qual o comprimento de onda que seleccionarias? Justifica.

b) Traça o gráfico que represente a absorvência em função da concentração de colesterol.



c) Indica a concentração de colesterol na amostra de sangue.

Cr terios de correc o

	Universidade de �vora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
Avalia�o de competências <i>Antes e após o desenvolvimento da actividade experimental</i>	Crêterios de correc�o	Prof. Rui Ferreira Prof. ^a . Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Sub tema - Determina o da actividade da fosfatase alcalina (ALP) a partir da velocidade inicial da sua reac o com o para-nitrofenilfosfato (p – NPP)



- a)
- 670 nm 50%
- porque   o comprimento de onda que corresponde ao m ximo de absorv ncia na regi o do vis vel 50%
- 100%
- b)
- Correspond ncia dos pares ordenados(6 10%) 60%
- Representa o da recta40%
- 100%
- c)
- 6 mM 100%
- Nota: Cada unidade   ponderada com 20%.

Resultados da avalia o

N�	a)		b)		c)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
1	100	100	80	80	100	100
2	100	100	20	100	95	95
3	50	100	90	90	100	99
4	50	50	40	90	0	75

IV. Auto-avaliação e grau de satisfação dos alunos

Questionário: Ficha de inquérito do sucesso de concretização da actividade desenvolvida com os alunos

	Universidade de Évora Escola Secundária Dom Manuel Martins	
<p style="text-align: center;">Questionário <i>A responder após o desenvolvimento da actividade experimental</i></p>	Física e Química A - 10ºE Área de Projecto - 12ºA	Prof. Rui Ferreira Profª. Isabel Alves-Pereira Prof. Paulo Ruivo

Grau de dificuldade

Considero que o grau de dificuldade do trabalho que desenvolvi é:

Adequado	
Não adequado	

Duração

Na minha opinião a duração de realização do trabalho foi:

Longa	
Boa	
Curta	

Meios de trabalho

Consideras que os meios de trabalho utilizados foram:

Adequados	
Insuficientes	

Grau de satisfação

O que gostei mais foi:

Da actividade experimental no seu todo (parte teórica e prática).	
Da componente prática.	
De trabalhar em grupo.	
De poder trabalhar e pôr em prática actividades laboratoriais. Ter oportunidade de contactar com aparelhos e substâncias novas. Realizar as actividades propostas e obter resultados interessantes.	
Da forma como os professores ensinavam.	
Outra. Explica se for este o caso.	

Identificação da menor satisfação

Onde senti menor satisfação no trabalho desenvolvido foi:

No início, quando tive de preparar e esterilizar os materiais necessários para o processo, porém é uma parte integrante de todo o trabalho de laboratório e como tal, essencial a este.	
Penso que nada me desagradou.	
Houve momentos em que o apoio prático disponível para os alunos não era a ideal.	
De necessariamente ter que esperar algum tempo até obter resultados para poder passar à fase seguinte.	
Outra situação. Explica se for este o caso.	

Dificuldades

A maior dificuldade que tive foi:

Em acompanhar o ritmo de aprendizagem, pois é em muito superior ao do 10º ano.	
Na compreensão do que era dito, mas nada que não fosse imediatamente resolvido.	
Pouco relevante, pois tive sempre o apoio dos professores.	
Em perceber muito bem como podem existir tantas etapas e tão complexas em seres unicelulares.	
Outra. Explica se for este o caso.	

Grau de satisfação e aprendizagem

Na minha opinião, com a actividade experimental desenvolvida:

A- aprendi de forma agradável

B- aprendi mas de uma forma um pouco aborrecida

C- não aprendi mas foi agradável ter trabalhado desta forma

D- não aprendi nem achei agradável ter trabalhado desta forma

Perspectivas futuras

Engenharia.	
Saúde.	
Ciências Experimentais (Biologia, Física, Química, Geologia).	
Matemática.	
Outra. Qual?	
Não sei.	

Sugestões

Dou como sugestão:

Incluir ainda mais prática no desenvolvimento de trabalhos desta natureza.	
Permitir que os alunos cometam os seus próprios erros, para que tirem partido deles.	
Continuar a oferecer esta oportunidade aos jovens de modo a proporcionar um contacto mais directo com este ambiente e actividades.	
Outra. Explica se for este o caso.	

Grau de concordância com as frases:

	Concordo totalmente	Concordo	Discordo	Discordo totalmente
Este trabalho ajudou-me a escolher a minha carreira futura.				
Tive oportunidade de participar no trabalho científico desenvolvido por profissionais.				
A componente prática do trabalho foi importante: aprendemos a teoria e como aplicá-la na prática.				
O professor incentivou-nos a reflectir e a questionarmos sobre todo o processo.				
Este trabalho permitiu-nos executar as técnicas estudadas em vez de ficarmos apenas a observar “como se faziam as coisas”.				
Formou-se um bom espírito de equipa que ajudou ao desenvolvimento do trabalho.				
Adquiri conhecimentos que podem vir a ser bastante importantes para o meu futuro profissional.				
O professor esteve sempre disponível para nos ajudar e para esclarecer todas as dúvidas que iam surgindo.				
O professor ajudou-nos a perceber para que serve o que aprendemos na teoria.				
Trabalhei com materiais e equipamentos que geralmente não utilizamos na escola.				
Este trabalho permitiu-me “entrar na pele” de um cientista, vivendo “in loco” o dia-a-dia da actividade científica.				
Gostaria de recomendar este trabalho aos meus amigos.				

V. Tratamento estatístico

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo "ANOVA I")

		Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
Proteína	Entre grupos	34,975	2	17,487	1540,379	,000
	Interior dos grupos	,068	6	,011		
	Total	35,043	8			
ALP	Entre grupos	9195,937	2	4597,968	226,160	,000
	Interior dos grupos	121,984	6	20,331		
	Total	9317,920	8			

Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo "ANOVA I")

		Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.	
avaliacao	antes depois	Inter-grupos	30471,462	1	30471,462	21,605	,000
		Intra-grupos	372345,820	264	1410,401		
		Total	402817,282	265			

Quadro A3 – Resultados da análise de variância (modelo "ANOVA I")

		Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
a	Entre grupos	19110,744	1	19110,744	8,725	,004
	Interior dos grupos	183986,395	84	2190,314		
	Total	203097,140	85			
b	Entre grupos	9005,357	1	9005,357	9,895	,003
	Interior dos grupos	36404,762	40	910,119		
	Total	45410,119	41			
c	Entre grupos	1352,557	1	1352,557	1,971	,164
	Interior dos grupos	59015,341	86	686,225		
	Total	60367,898	87			
d	Entre grupos	451,563	1	451,563	1,567	,231
	Interior dos grupos	4034,375	14	288,170		
	Total	4485,938	15			
e	Entre grupos	5439,063	1	5439,063	5,298	,037
	Interior dos grupos	14371,875	14	1026,563		
	Total	19810,938	15			
f	Entre grupos	2688,167	1	2688,167	3,620	,050
	Interior dos grupos	16337,167	22	742,598		
	Total	19025,333	23			

