

Educação e Formação: Ciência, Cultura e Cidadania



ACTAS

XIII ENCONTRO NACIONAL DE EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS



CASTELO BRANCO
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

Estes textos são da responsabilidade dos seus autores e não expressão necessariamente a posição dos coordenadores destas Actas. Além disso, respeitou-se a diferença das diversas línguas Ibero-americanas usadas

Ficha Técnica

Título: Educação e Formação: Ciência, Cultura e Cidadania. Actas XIII Encontro Nacional de Educação em Ciências.

Coordenação: Fátima Paixão, Fátima Regina Jorge

Organização da Edição: Paulo Silveira

Colaboração na Edição: Ana Farias, Gonçalo Gomes

Capa: Sónia Balau

ISBN: 978-989-95831-2-2

Editor: Escola Superior de Educação, Instituto Politécnico de Castelo Branco

Tiragem: 300 exemplares

Impressão do CD: CIDTFF, Universidade de Aveiro

Publicação: Setembro de 2009

Apoios à edição: FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia

CIDTFF – Centro de Investigação Didáctica e Tecnologia na Formação de Formadores, Universidade de Aveiro

Vanádio como modelador do crescimento de leveduras vínicas do Alentejo - uma actividade que ilustra a influência dos metais nos sistemas vivos, contextualizada às ciências experimentais para o ensino secundário

Paulo Ruivo^{1,2}, Isabel Alves-Pereira^{2,3}, Rui Ferreira^{2,3*}

1 Escola Secundária Dom Manuel Martins, Av. António Sérgio, Setúbal

2 Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, R. Romão Ramalho, 59, 7002-554 Évora

3 Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Centro de Tecnologia Animal (ICAM-CTA), Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-774 Évora

*raf@evora.pt

Resumo

Actividades humanas como a queima de combustíveis fósseis, produção de fitofármacos e de ligas metálicas contribuem para o aumento acentuado dos níveis ambientais do vanádio em determinadas regiões do globo terrestre, tornando-o um poluente. As interferências que este metal de transição pode exercer nos seres vivos pode ser ilustrada recorrendo a culturas de leveduras, organismos eucariotas unicelulares, excelentes para treinar estudantes em actividades de química, ambiente e vida. O desenvolvimento da actividade de investigação 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 interfere no crescimento da levedura vínica *S. cerevisiae*. Os resultados experimentais obtidos em cada fase desta actividade de investigação mobilizou 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, revelou que os alunos melhoraram o seu grau de cumprimento, adquirindo desse modo uma aprendizagem significativa.

Palavras-chave: vanádio, ambiente, *S. cerevisiae*

Introdução

O vanádio, V constituiu um dos elementos amplamente distribuídos no meio ambiente, ocorrendo naturalmente na crosta terrestre numa concentração aproximada de 150 ppm (Rodríguez-Mercado, 2006; Pyrzyńska, e Wierzbicki, 2004; Zoroddu, 1996). Actividades humanas contribuem para o aumento acentuado dos níveis ambientais deste elemento em diversas regiões da Terra, facto que o torna um poluente na periferia de complexos industriais (Penueles, 2002). Embora pareça ser um metal essencial para o metabolismo de alguns microrganismos, torna-se tóxico quando ingerido em quantidade excessiva (Huang,

2000; Willsky, 1990). As 64000 t de vanádio libertadas por ano para a atmosfera geram depósitos na crosta terrestre onde este elemento ocorre em níveis muito superiores aos de locais com baixo índice de poluição (Manane, 1998). Esses depósitos, muitas vezes na forma de fosfatos, atingem os seres vivos que os utilizam na sua dieta, tornando-se contaminantes da cadeia alimentar Humana (Healy, 1973). O metavanadato de amónio, onde o vanádio se encontra na forma pentavalente (V^{+5}), é um dos compostos mais utilizados pela indústria química e encontra-se entre aqueles que apresentam maior toxicidade (Barceloux, 1999), traduzida em muitos casos pela inibição de enzimas como ATPases (Adachi, 2000; Hamada, 1998; Puri, 1998; Cantley, 1978).

A facilidade de cultivar leveduras em condições controladas permite a realização de actividades experimentais no domínio da química ambiental que geram resultados com reprodutibilidade elevada. Este trabalho decorreu em diferentes sessões laboratoriais ao longo de 4 semanas, tendo sido utilizada uma levedura nativa do Alentejo como modelo biológico.

O plano da aula, bem como, os protocolos experimentais foram elaborados no âmbito do trabalho de dissertação de Mestrado de Química em Contexto Escolar desenvolvido pelo primeiro autor deste trabalho. Nesta actividade experimental pretendemos, numa primeira fase, avaliar o efeito do vanádio no crescimento da *S. cerevisiae*, com respectiva contextualização ao ensino das ciências experimentais, alvo que mereceu importância particular tendo em conta a progressiva contaminação de águas, solos e alimentos com esse elemento, a qual contribui para a sua absorção excessiva pelos seres vivos.

Por outro lado a *S. cerevisiae* é um organismo GRAS com baixo risco de toxicidade para o Homem, facto que justifica a sua adequação a trabalhos experimentais no âmbito do desenvolvimento de conhecimentos e competências no domínio dos metais ambiente e vida com alunos do ensino secundário.

Nesse contexto, realizaram-se ensaios *in vivo* que permitiram avaliar o perfil de crescimento da levedura em meio YPD, bem como a resposta ao vanádio por populações de levedura *S.cerevisiae* UE-ME₃, presente na concentração de 25 e 75 mM, recorrendo a técnicas de preparação de meios de cultura sem e com vanádio, inoculação e crescimento de leveduras em meios líquidos e sólidos, sendo utilizado como parâmetro, o crescimento.

Objectivos

Gerais

Os objectivos gerais definidos para esta actividade contemplaram a monitorização do crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPD e a comparação do seu crescimento na ausência e na presença de metavanadato de amónio.

Específicos

Os objectivos específicos que se pretendeu atingir com esta actividade incluíram conhecer, compreender e dar valor: aos cuidados de assépsia a desenvolver para cultivar microrganismos; à determinação e medição de massas de constituintes minerais e orgânicos para preparar os meios de cultura; à selecção de dispositivos de medição de volumes para preparar com exactidão e precisão, meios YPD; aos procedimentos a tomar para inocular os meios com a levedura *S. cerevisiae*, a partir de selantes; à curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae*; à monitorização visual e instrumental, pela turbidez, do seu crescimento ao longo do tempo; aos procedimentos a tomar para inocular a levedura em fase exponencial média de crescimento em meios sólidos, com concentração diferente de metavanadato de amónio; à resposta da *S. cerevisiae*, à presença do vanádio, um metal de transição, no meio de cultura.

Competências a desenvolver

No que diz respeito às competências a desenvolver esperava-se que do ponto de vista processual os estudantes ficassem capazes de identificar, seleccionar e esterilizar material de laboratório de forma adequada para desenvolver uma actividade experimental, onde seja testada a influência dos metais na vida, recorrendo a microrganismos como modelo de estudo; identificar o equipamento de laboratório assim como explicar a sua utilização/função para esterilizar material e soluções, para medir massas de reagentes, com a precisão adequada; inocular meios de cultura, bem como determinar a turbidez, com correcção, respeitando as normas de segurança laboratorial; identificando e manipulando material que permita a medição de volumes na ordem dos μL . Sob o ponto de vista conceptual esperava-se que os estudantes ficassem capazes de interpretar a simbologia de uso corrente em laboratórios de Química que inclui regras de segurança de pessoas e instalações, armazenamento, manipulação e eliminação de resíduos; aplicar conceitos de

massa, volume, quantidade e concentração, tendo em vista a preparação de meios de cultura; discutir os limites de validade dos resultados obtidos respeitantes ao observador, aos instrumentos e às técnicas utilizadas para monitorizar o crescimento da *S. cerevisiae* na ausência e na presença de vanádio; identificar os parâmetros que poderão afectar um dado fenómeno, como o crescimento microbiano e planificar modos de o controlar; formular hipóteses que permitam interpretar o efeito dos metais. Quanto às competências do tipo social, atitudinal e axiológico esperava-se que os alunos ficassem capazes de apresentar e discutir na turma propostas de trabalho e os resultados obtidos.

Competências avaliadas

No que se refere às competências específicas avaliadas incluiu-se a obtenção de suspensões, tomando como exemplo extractos de origem biológica, procedendo à sua caracterização físico-química; reconhecimento de que a luz difundida por uma suspensão pode ser utilizada para determinar o crescimento da levedura *S. cerevisiae*; planificação de uma actividade experimental que permita avaliar a influência de um metal no crescimento celular; escolha e manuseamento adequado do material e equipamento necessário à execução dessa actividade experimental previamente planeada, bem como, a obtenção com precisão adequada de resultados experimentais que ilustrem a influência dos metais sobre os sistemas vivos.

Desenvolvimento da actividade

O Desenvolvimento desta actividade de investigação, decorreu em dois instantes distintos, aquele onde ocorreu uma exposição teórica do trabalho com a planificação acompanhada da actividade experimental e aquele onde decorreu o desenvolvimento da actividade experimental propriamente dita, distribuída por 3 fases: (a) preparação dos meios YPD líquido e sólido, YPD com NH_4VO_3 sólido; (b) inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e o acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez; (c) inoculação dos meios sólidos com a levedura seguido pela determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos.

O tema escolhido destaca a relevância dos metais para o ambiente e para a vida, enquadrando-se na unidade temática II - Na atmosfera da Terra: radiação, matéria e estrutura.

Estratégia

Em termos de estratégia laboratorial o cumprimento dos objectivos definidos para este trabalho obedeceu ao plano que passaremos a descrever (Domingos, 1987):

Abordagem experimental

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 com NH₄VO₃ utilizados no crescimento de leveduras, a monitorização da sua curva de crescimento e determinação qualitativa da densidade celular nos diferentes tratamentos com leveduras crescidas durante 72 h, a 28 °C e de acordo o esquema presente no quadro:

I	controlo
II	Exposição ao NH ₄ VO ₃ , 25 mM
III	Exposição ao NH ₄ VO ₃ , 75 mM

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 e da determinação qualitativa da densidade celular em placa, relativo aos diferentes tratamentos que se encontravam correlacionados com as características dos meios YPD e YPD com NH₄VO₃.

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, bem como, a determinação da turbidez do meio por espectrómetro de absorção molecular.

Abordagem pedagógica

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 21 membros, a frequentarem a disciplina de Física e Química A (ano I), do 10º ano de escolaridade, da Escola Secundária Dom Manuel Martins de Setúbal. A distribuição etária dos participantes localizava-se entre os 15 (13%) e os 22 (4%) anos de idade, com o máximo etário gaussiano, localizado em torno dos 16 anos (52%), os quais se encontravam todos a frequentar pela 1ª vez a disciplina de Física e Química A (100%). Os alunos participantes foram integrados nas diferentes fases da actividade experimental que decorreram durante o 3º período do ano lectivo 2008/2009.

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, executando protocolos que envolveram a cultura de *S. cerevisiae*, a construção da curva de crescimento e a determinação da resposta ao sal pentavalente de vanádio presente no meio de cultura. As células cresceram até à fase exponencial média em banho de água com agitação orbital, à temperatura de 28°C, em erlenmeyers de 250-mL contendo 100 mL de meio YEPD (glucose 2% (w/v)). A curva de crescimento foi traçada lendo a turbidez do meio num espectrómetro de absorção molecular, Hitachi-U1500. Células na fase exponencial média foram inoculadas em meio sólido, na ausência e na presença de NH_4VO_3 incubadas durante 72h a 28 °C.

Avaliação da actividade

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 três 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 três fases da actividade experimental (a,b,c) recorrendo a ANOVA II, seguida pelo teste *post-hoc* HSD de Tuckey. Recorreu-se ao *Software* SPSS (v 16; 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 questionário de opinião. Os resultados foram analisados pelo valor percentual de respostas obtidas em cada item.

Resultados

Nesta aproximação experimental os alunos adquiriram conhecimentos básicos acerca dos cuidados a ter na preparação dos materiais e dos meios de cultura, nomeadamente pesagem de reagentes e esterilização, para ensaios de microbiologia aplicados a estudos ambientais e à importância desses cuidados na fiabilidade dos resultados.

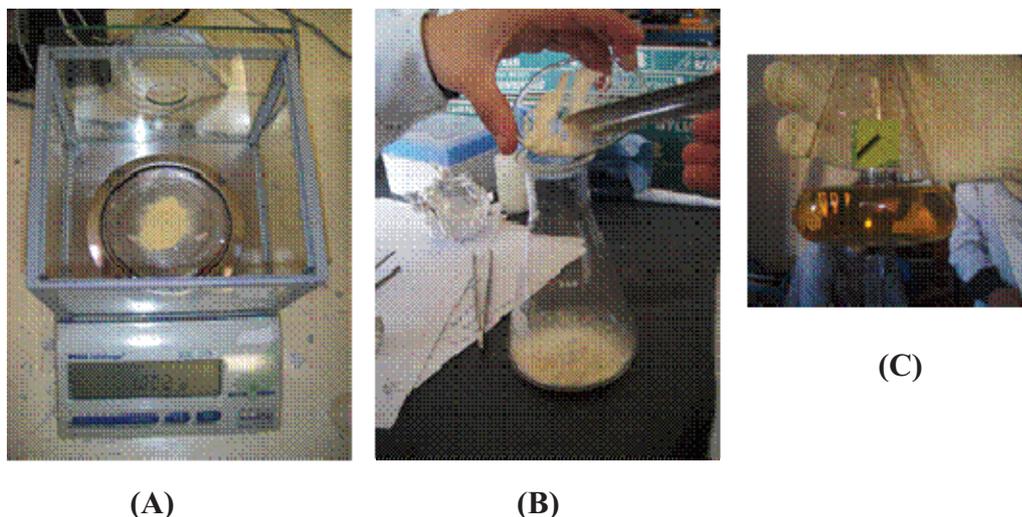
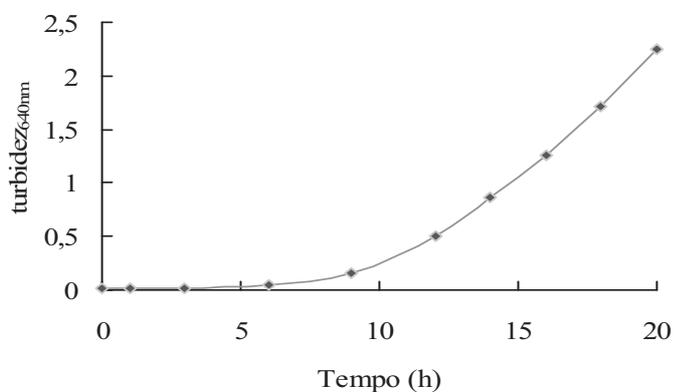


Fig.1 Pesagem de constituintes e preparação de meio de cultura (A, B); meio de cultura líquida após esterilização em autoclave (C),

Consecutivamente, os estudantes procederam à inoculação de meio YPD líquido e sólido e YPD com NH_4VO_3 sólido, bem como a leituras de turbidez a 640 nm no meio líquido que utilizaram para construírem a curva de crescimento da *S. cerevisiae* (Fig. 1 e 2), avaliando posteriormente a sobrevivência da levedura ao NH_4VO_3 , na concentração de 25 e 75 mM no meio por determinação qualitativa da densidade celular (Fig. 3).



(A)



(B)

Fig. 2 Leitura da turbidez no espectrómetro de absorção molecular (A). Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* obtida a 28°C a partir de leituras de turbidez a 640 nm.

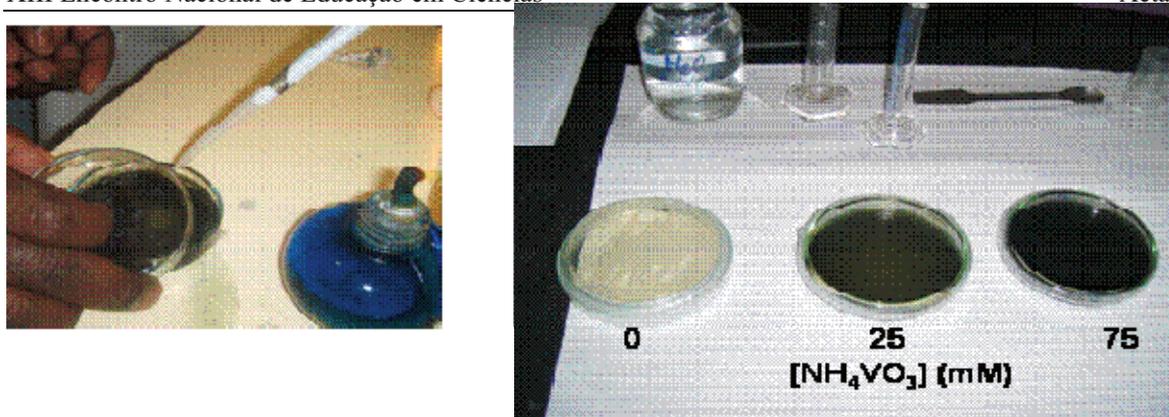


Fig. 3 Inoculação de meio YPD sólido com metavanadato de amónio (A). Observação do crescimento da *S. cerevisiae* durante 72 h a 28 °C (B).

A figura 4 mostra-nos que a pontuação média obtida antes e após a actividade experimental 28,65 % e 49,72 %, respectivamente, revelaram uma evolução global positiva das competências desenvolvidas pelos alunos. O teste t-student revelou que essa evolução corresponde a uma diferença altamente significativa com um acréscimo de 21,08 pontos percentuais, na pontuação média obtida após o desenvolvimento da actividade experimental ($p < 0,05$).

A figura 5 mostra-nos de forma mais detalhada um efeito positivo, com significado estatístico das fases de desenvolvimento experimental (a) preparação dos meios YPD líquido e sólido, YPD com NH_4VO_3 sólido e (b) inoculação de meio de cultura líquido com a levedura e o acompanhamento do crescimento das leveduras por leituras de turbidez ($p < 0,05$) e do instante de avaliação, antes e após ($p < 0,05$) sobre a pontuação obtida na avaliação.

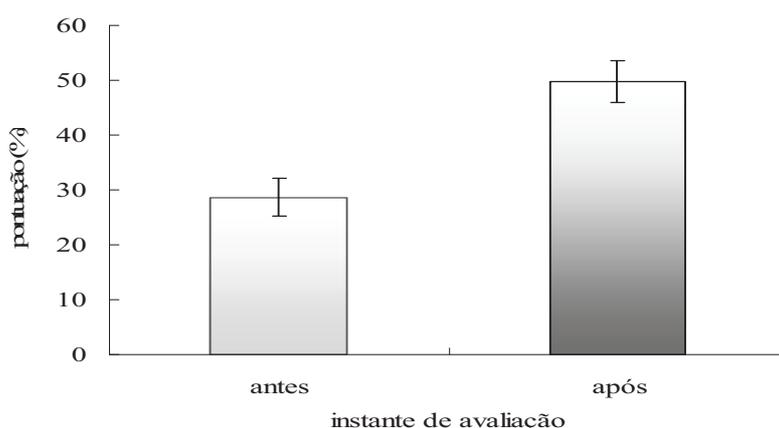


Fig. 4 Pontuação média obtida pelos alunos, antes e após o desenvolvimento da acção. Os valores são apresentados como a média \pm SEM e as diferenças observadas entre as médias dos dois grupos são estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

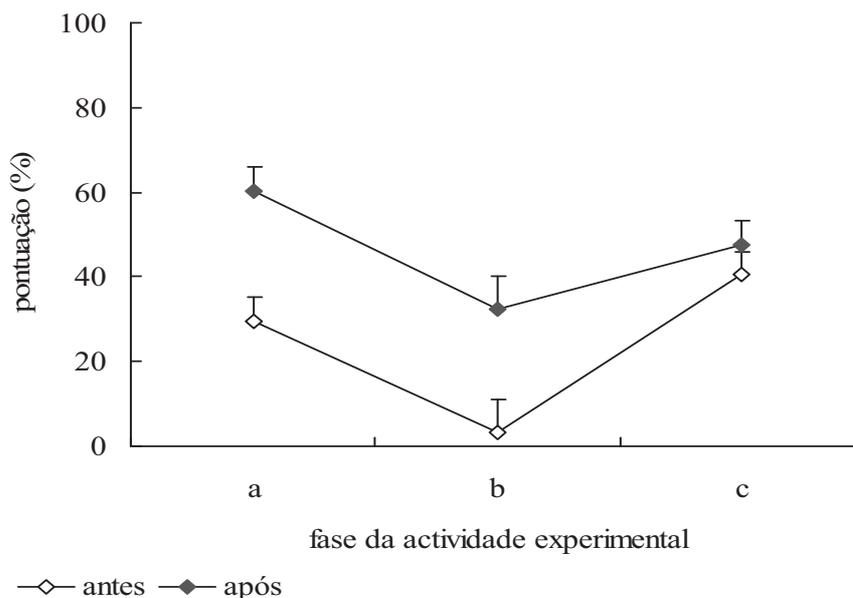


Fig. 5 Pontuação média obtida pelos alunos, antes e após o desenvolvimento da acção em cada fase da actividade experimental. Os valores são apresentados como a média \pm SEM e as diferenças observadas entre as médias dos dois grupos são estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados referentes ao inquérito de opinião relativo à actividade de investigação onde os alunos expressam a forma como avaliaram o apoio teórico e experimental do docente, o impacto da actividade nos seus conhecimentos acerca da investigação com microrganismos, bem como, as suas aplicações em estudos com metais, revelam que a maioria dos inquiridos consideraram a dimensão da actividade boa (78%), assim como, a adequação dos meios de trabalho (87%) e do grau de dificuldade (83%). Em termos do grau de satisfação 52% dos estudantes gostaram de poder trabalhar e de pôr em prática actividades laboratoriais, bem como da oportunidade de contactar com aparelhos e substâncias novas. No que diz respeito aos aspectos que menos gostaram, estes prenderam-se com os tempos de espera (39%), embora a mesma percentagem de alunos não refira qualquer aspecto considerável. Relativamente ao grau de satisfação e aprendizagem, a maioria dos alunos (78%) consideraram que aprenderam de forma agradável. Na sua maioria os alunos (65%) sugerem que se continue a oferecer esta oportunidade aos jovens de modo a proporcionar um contacto mais directo com actividades em ambiente de investigação.

Conclusões

Ao longo desta actividade de investigação os alunos da turma-piloto que frequentam a disciplina Física e Química A (ano I) do 10º ano de escolaridade puderam participar

activamente no planeamento e na preparação de uma actividade laboratorial que permitiu avaliar de forma simples como o vanádio pode influenciar o crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃. Inicialmente, os alunos prepararam e esterilizaram meios de cultura, facto que permitiu ampliar valências correlacionadas com o acto de pesar substâncias, medir volumes com rigor e manter condições de assépsia indispensáveis à cultura de microrganismos com aplicação em estudos ambientais. Os resultados experimentais obtidos em cada fase, nomeadamente a curva de crescimento da *S. cerevisiae* e a resposta ao metavanadato de amónio despertou nos estudantes elevada curiosidade para novos ensaios a realizar posteriormente onde serão quantificadas proteínas e actividades enzimáticas que permitirão monitorizar a resposta ao vanádio ao nível molecular. Estes factos ilustraram como as leveduras podem ser utilizadas em estudos ambientais que procurem esclarecer como metais presentes nos habitats afectam a sobrevivência celular. 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 revelou que estes melhoraram o seu grau de cumprimento, adquirindo desse modo uma aprendizagem significativa.

Agradecimentos Agradecemos ao Eng^o Paulo Laureano do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora pela cedência da estirpe de levedura.

Referências Bibliográficas

- Adachi, A. & Asai, K. (2000). Subacute vanadium toxicity in rats. *J. Health Sci.*, 6, 503-508.
- 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.
- Domingos, A.M., Neves, I.P. & Galhardo, L. (1987). Uma forma de estruturar o ensino e a aprendizagem, Livros Horizonte, LDA, Lisboa.
- 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.
- 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 & Shi, X. (2000). Vanadate induces p53 transactivation trough hydrogen peroxide and causes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 259, 13273-13281.

- 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.
- Penuelas, J. & Filella, I. (2002). Metal pollution in Spanish terrestrial ecosystems during twentieth century. *Chemosphere* 46, 501-505.
- Puri, S., Dubey, R. K., Gupta, M. K., Puri, B. K. (1998). Differential pulse polarographic determination of trace amounts of vanadium and molybdenum in various standard alloys and environmental samples after preconcentration of their morpholine-carbodthioates on microcrystalline naphthalene on morpholine-4-dithiocarbamate cetyltrimethyl ammonium bromide naphthalene adsorbent, *Talanta*, 46 (4), 655-664.
- Pyrzynska, K. & Wierzbicki, T. (2004). Determination of vanadium species in environmental samples. *Talanta* 64, 823-830.
- Rodríguez-Mercado, J. J. & Altamirano-Lozano, M. A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22, 173-184
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1997). *Biometry*. W. H. Freeman, New York
- Willsky, G. R. (1990). Vanadium in the biosphere. In N. D. Chasteen. (Ed.), *Vanadium in Biological Systems*, 1-24, Kluwer Academic Publishers, Netherlands,.
- 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.