

Escola Secundária de Marques de Castilho - Águeda

Oficina de Formação

“Utilização e Organização dos Laboratórios Escolares”

Protocolo de Actividade Prática

“Testar os Efeitos de Substâncias Químicas no Ritmo Cardíaco em *Daphnia magna*”

1

Formando

Patrício José de Almeida Soares Gameiro

Formador

Prof. Doutor Vítor Duarte Teodoro

Leiria | Julho 2010



INTRODUÇÃO

MORFOLOGIA

Daphnia magna é um pequeno crustáceo de água doce. É um organismo de tamanho reduzido (0,2mm a 5 mm), em que o tórax e o abdómen estão cobertos por uma carapaça bivalve (2 valvas simétricas) com uma abertura ventral posterior, por onde saem os apêndices torácicos (patas) e o post-abdómen, ficando de fora apenas a cabeça com duas grandes antenas que funcionam como apêndices natatórios.



Fig. 1 - Aspecto geral

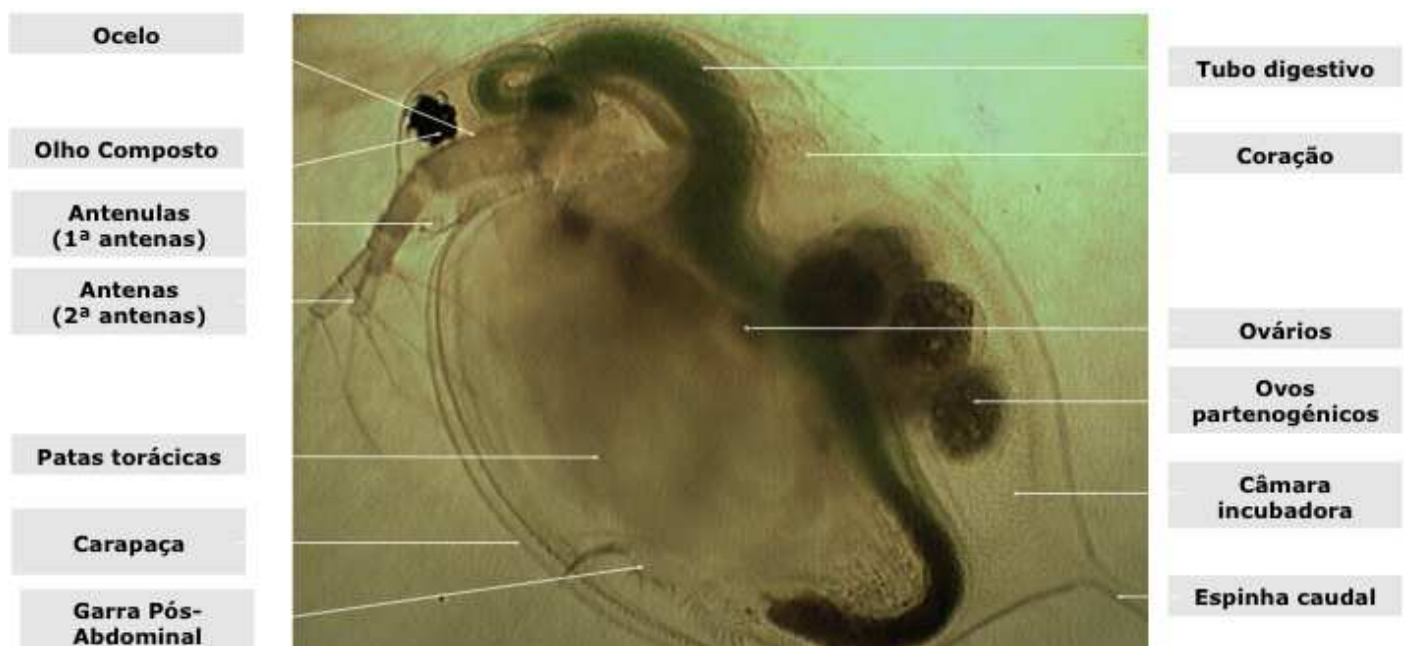


Fig. 2 - Morfologia geral

Como todos os Crustáceos possuem uma carapaça externa ou exosqueleto transparente que, possibilita a visualização dos seus órgãos internos e sofre mudas frequentes.

Apresenta um par de olhos compostos, de grandes dimensões, relativamente ao tamanho do corpo, e um par de pequenos ocelos que apenas são sensíveis à direcção e intensidade da luz.

Os machos possuem um rostro mais proeminente e um maior desenvolvimento do primeiro par de antenas e das cerdas existentes na parte posterior da face ventral. Em ambos os sexos existe uma garra pós-abdominal com funções de higiene e defesa.



Fig. 3 - Fêmea



Fig. 4 - Macho

3

O nome vulgar, “pulga de água”, resulta do seu tipo de locomoção, em pequenos saltos, provocado pelo movimento do segundo par de antenas.



Fig. 5 - Diferentes espécies de Dáfnias.

ECOLOGIA

As Dáfnias pertencem ao zooplâncton e são organismos filtradores que retêm todo o tipo de partículas, seleccionando-as apenas pelo tamanho. Alimentam-se de bactérias, fitoplâncton e detritos.

Os movimentos dos apêndices torácicos, abundantemente ciliados, criam uma permanente corrente de água entre as valvas. Isto permite por um lado a oxigenação do sangue e por outro a filtração da água e retenção do alimento, que é encaminhado para a boca.

A evolução das populações de Dáfnias está bastante dependente da temperatura, do alimento disponível e da predação que sobre elas se exerce. A Dáfnia é a presa principal de várias espécies de peixes.

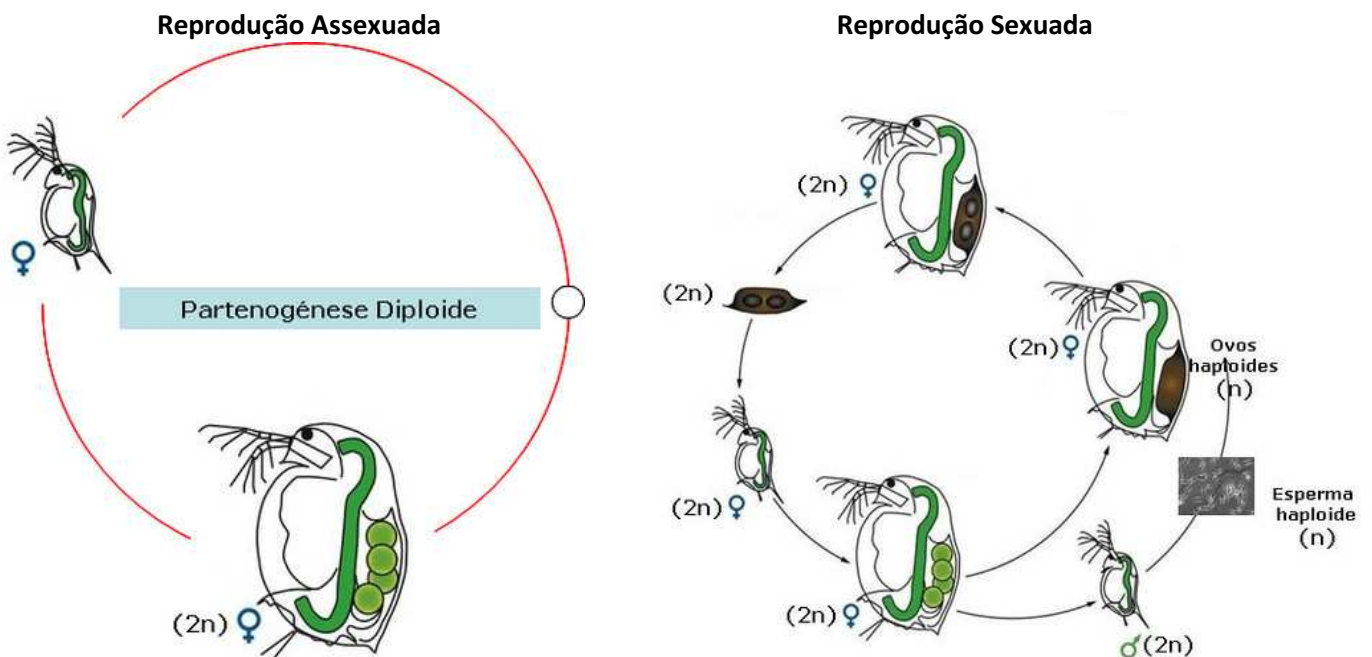


Fig. 6 - As Dáfnias na cadeia alimentar.

REPRODUÇÃO

A Dáfnia, de acordo com as condições ambientais, pode reproduzir-se assexuadamente por partenogénese ou sexuadamente. As suas populações são, durante a maior parte do tempo, constituídas exclusivamente por fêmeas que se reproduzem por partenogénese cíclica. Os ovos não fecundados, ovos partenogénicos ou ovos de verão, dão origem a fêmeas morfológicamente iguais aos adultos.

Quando as condições ambientais não são favoráveis, baixas temperaturas, pouco alimento, o meio saturado com produtos metabólicos, presença de predação e competição, o tipo de reprodução mais frequente é a sexuada. Nestas circunstâncias, pode observar-se uma população, não apenas, geneticamente diversa, como também, com um número crescente de machos.



MODELO BIOLÓGICO

Daphnia magna apresenta características vantajosas que a tornam um excelente organismo teste:

- Animal fácil de cultivar em laboratório, com baixo custo, proporcionando um elevado número de organismos;
- Requer pouco espaço e pequenas quantidades de soluções aquosas, devido às reduzidas dimensões;
- Possui um ciclo de vida curto, relativamente ao ciclo biológico de outras espécies (ex. peixes, mamíferos);
- Apresenta elevada fecundidade e reprodução partenogénica, sendo fácil a obtenção de populações homogéneas em termos de tamanho, idade e sexo, o que permite eliminar a variabilidade genética dos ensaios;
- Apresenta uma ampla distribuição geográfica e importância ecológica com significativo relevo nas cadeias alimentares de água doce;
- Possui elevada sensibilidade a uma grande variedade de tóxicos.
- Muito utilizada em testes toxicológicos para avaliação dos efeitos de agentes químicos de efluentes urbanos e industriais.

Este organismo possui respostas biológicas fundamentais muito semelhantes às humanas e, dado ser perfeitamente transparente, os seus órgãos internos são visíveis ao microscópio, podendo observar-se, por exemplo, o tubo digestivo, o batimento do seu coração, a fecundidade ou o funcionamento do seu olho.

Daphnia magna, é ideal para projectos científicos que monitorizam o ritmo cardíaco e testam a qualidade da água.

5

OBJECTIVOS

- **Observar**, ao microscópio óptico composto, a estrutura geral da espécie *Daphnia magna*;
- **Identificar** os órgãos internos da espécie usada na actividade;
- **Distinguir** as estruturas reprodutoras nas Dáfnias;
- **Contar** os batimentos cardíacos das Dáfnias em diferentes meios;
- **Prever** os efeitos das substâncias químicas na actividade cardíaca das Dáfnias;
- **Inferir** sobre os efeitos das substâncias químicas na espécie *Daphnia magna* na espécie humana.

METODOLOGIA

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

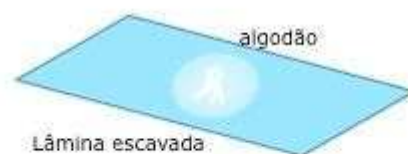
Material

- Microscópio óptico.
- Lâmina escavada.
- Lamela.
- Gobelés.
- Pipeta Pasteur.
- Papel de filtro.
- Papel de limpeza.
- Soluções W, X, Y e Z.

Procedimento

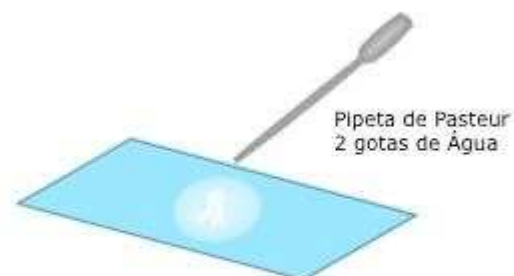
A. Elaboração da Preparação Microscópica.

A₁ - Com a ajuda de uma pinça colocar alguns fios de algodão na depressão da lâmina escavada (apenas os suficientes para aprisionar a Dáfnia).

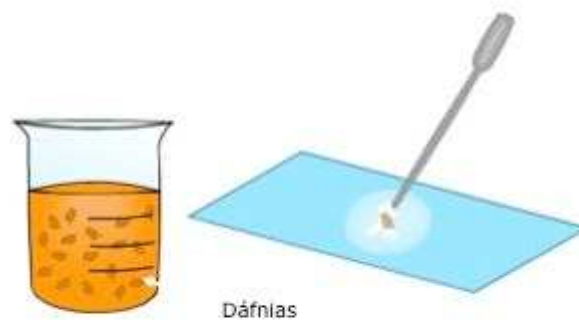


Cuidado
Algodão em excesso, impede a observação da Dáfnia

A₂ - Adicionar 2 gotas da água do gobelé com as Dáfnias, com uma pipeta de Pasteur de 3 ml.



A₃ - Usando a mesma pipeta de Pasteur recolher uma Dáfnia e colocá-la em cima dos fios de algodão (evitar colocar mais do que duas gotas de água com a Dáfnia).



B. Observação ao Microscópio Óptico Composto (MOC).

B₁ - Colocar a preparação na platina e acender a luz (menor intensidade possível).



Cuidado

A luz do microscópio aquece a água e a Dáfnia, provocando-lhe stress.

B₂ - Mover o parafuso macrométrico e, observando através da(s) ocular(es), focar a preparação.



B₃ - Utilizando apenas o parafuso micrométrico, corrigir a focagem até obter uma imagem nítida.



B₄ - Observar a Dáfnia, prestando particular atenção à localização do coração.

C. Contagem dos Batimentos Cardíacos - Controlo (Água).

O ritmo cardíaco das Dáfnias varia entre 200 a 300 Batimentos cardíacos Por Minuto (BPM), dependendo do tamanho e da idade das mesmas.

Técnica de Contagem dos Batimentos Cardíacos

Para determinar o ritmo cardíaco da Dáfnia, um aluno bate com a ponta de um lápis numa folha de papel, fazendo um ponto por cada batimento cardíaco que observar, enquanto outro elemento controla o tempo (10 segundos) com um cronómetro ou relógio. No final, conta-se o número de pontos registados.

C₁ - Efectuar a contagem: um elemento do grupo bate com a ponta do lápis na folha de papel por cada batimento cardíaco, enquanto outro elemento controla o tempo (10 segundos), com um cronómetro ou relógio.

(Nota: As contagens devem ser realizadas rapidamente. Se as contagens demorarem muito tempo, adicionar mais uma ou duas gotas de água à preparação.)

C₂ - No final dos 10 segundos, contar o número de pontos na folha de papel, multiplicar a contagem obtida para os 10 segundos por 6 para determinar os BPM e registar o valor no QUADRO I.

(Nota: Se se verificarem contagens com valores superiores a 300 BPM ou inferiores a 200 BPM, deve repetir a contagem.)

QUADRO I - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para o Controlo - Água

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.		X 6	
	B - 2ª Contagem.		X 6	
	C - 3ª Contagem.		X 6	
Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		

C₃ - Determinar e registar o ritmo cardíaco da Dáfnia pela 2ª e 3ª vez, 10 segundos cada, e multiplicar os valores obtidos por 6 e registar os valores no QUADRO I. Estes são os valores do ritmo cardíaco (BPM) da Dáfnia para o controlo (água).

C₄ - Somar os 3 valores do ritmo cardíaco (BPM) e dividir esse valor por 3 (número de contagens), obtendo a média do ritmo cardíaco (BPM) para a Dáfnia em condições controlo (água).

C₅ - Inserir a média obtida no QUADRO III (pág. 10).

8

D. Adição da substância.

D₁ - Retirar a preparação do microscópio.

D₂ - Usando a pipeta de Pasteur de 1 ml colocar uma ou duas gotas da solução A, por exemplo, do lado direito da Dáfnia, enquanto com uma tira de papel de filtro, se absorve a água em excesso, pelo lado esquerdo.

D₃ - Permitir que a solução se difunda por um minuto.

D₄ - Voltar a colocar a preparação no microscópio e observar a Dáfnia, com baixa intensidade luminosa.

E. Contagem dos Batimentos Cardíacos - Soluções (W, X, Y e Z).

E₁ - Efectuar a contagem da mesma forma como o indicado em **C** (Controlo - Água).

E₂ - Registar os dados nos quadros seguintes.

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução **W**

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.		X 6	
	B - 2ª Contagem.		X 6	
	C - 3ª Contagem.		X 6	
W - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução **X**

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.		X 6	
	B - 2ª Contagem.		X 6	
	C - 3ª Contagem.		X 6	
X - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução **Y**

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.		X 6	
	B - 2ª Contagem.		X 6	
	C - 3ª Contagem.		X 6	
Y - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução **Z**

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.		X 6	
	B - 2ª Contagem.		X 6	
	C - 3ª Contagem.		X 6	
Z - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		

E₃ - Inserir as médias **W**, **X**, **Y** e **Z** no QUADRO III.

QUADRO III - Resultados

GRUPOS	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
SOLUÇÃO	W	X	Y	Z
BPM (Controlo) (A)				
BPM (Solução) (B)				
% Variação BPM [(B - A)/A] x 100				
CLASSIFICAÇÃO				

E₄ - Classificar cada uma das soluções W, X, Y e Z (**E** - Estimulante ou **D** - Depressora).

SUGESTÕES DE UTILIZAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

- Cada grupo de trabalho testará apenas uma só solução;
- A identificação das soluções só será feita quando todo o procedimento experimental estiver concluído;
- Poderá ser testada uma única substância em cada aula, usando diferentes concentrações da mesma.

Procedimento Pré-laboratorial

Preparação de Soluções

Antes de realizar a actividade, é aconselhável preparar todas as soluções experimentais (substâncias), com cerca de 24 h de antecedência. Aproximadamente 1 hora antes de iniciar a actividade experimental, colocar 2 ou 3 Dáfnias (juvenis, a partir do 4º dia) num gobelé (um por grupo) com água mineral de pH ~7 (idêntica à do meio de cultura).

Solução **W** - Cafeína (Café 30%):

Juntar 4 ml de água destilada ao frasco que contém cafeína e agitar até dissolver; esta solução contém uma concentração em cafeína correspondente a 30% de um café forte (Um café forte, contém, em média, 100 mg de cafeína por chávena (45 ml), correspondendo a uma concentração de cafeína de 2,2 mg/ ml.)

Com uma proveta, medir 30 ml de café forte, juntar água destilada até perfazer 100 ml e agitar – Solução a 30%.

Solução **X** - Cafeína (Coca-Cola 30%):

Deixar o recipiente de Coca-Cola aberto durante a noite (para permitir que o gás dissipe) antes de fazer soluções. Com uma proveta, medir 30 ml de coca-cola, juntar água destilada até perfazer 100 ml e agitar – Solução a 30%.

Solução **Y** - Álcool (Cerveja 30%):

Deixar o recipiente de cerveja aberto durante a noite (para permitir que o gás dissipe) antes de fazer soluções. Com uma proveta, medir 30 ml de cerveja, juntar água destilada até perfazer 100 ml e agitar – Solução a 30%.

Solução **Z** - Álcool (Shot 30%):

Com uma proveta, medir 30 ml de shot, juntar água destilada até perfazer 100 ml e agitar – Solução a 30%.

Teores médios de Cafeína:

Bebida	Teor de Cafeína (mg)	Quantidade
Café expresso	104 -125	1 chávena 45 ml
Café solúvel(instantâneo)	50 - 100	1 chávena 45 ml
Café coado	80 - 135	1 chávena 150 ml
Descafeinado	1 - 2	1 chávena 45 ml
Chá preto	50 - 80	1 chávena 150 ml
Refrigerante de Cola	35 - 46	1 lata 330 ml
Bebida Energética	80	1 lata 330 ml
Chocolate quente	5 - 7	1 chávena 150 ml

Exemplos de Soluções de Álcool etílico:

Bebida	% Álcool	Álcool etílico 96% (ml)	Água destilada (ml)
Cerveja sem álcool	0,5%	0,52	99,48
Cerveja	5,6 %	5,83	94,17
Vinho	12 %	12,50	87,50
Vodka	40 %	41,6	58,33

NOTA: Em alternativa podem ser usadas soluções de diferentes tipos de detergentes (sabão azul ou rosa, skip ou ultra, sonasol e lixívia) ou soluções de diferentes medicamentos (analgésicos, calmantes, etc).

PREVISÃO DE RESULTADOS

QUADRO I - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para o Controlo - Água

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.	34	X 6	204
	B - 2ª Contagem.	35	X 6	210
	C - 3ª Contagem.	36	X 6	216
Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		210

Se se verificarem contagens com valores superiores a 300 BPM ou inferiores a 200 BPM, deve-se repetir a contagem.

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução W

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.	42	X 6	252
	B - 2ª Contagem.	44	X 6	260
	C - 3ª Contagem.	46	X 6	276
W - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		260

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução X

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.	38	X 6	228
	B - 2ª Contagem.	40	X 6	240
	C - 3ª Contagem.	42	X 6	252
X - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		240

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução Y

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.	30	X 6	180
	B - 2ª Contagem.	32	X 6	198
	C - 3ª Contagem.	34	X 6	204
Y - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		198

QUADRO II - Ritmo Cardíaco da Dáfnia para a solução Z

Controlo (Água)		BPM (Ritmo Cardíaco por Minuto)		
Ritmo Cardíaco / 10 seg.	A - 1ª Contagem.	8	X 6	48
	B - 2ª Contagem.	10	X 6	60
	C - 3ª Contagem.	12	X 6	72
Z - Média do Ritmo Cardíaco / min.		(A+B+C) / 3		60

QUADRO III - Resultados

GRUPOS	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
SOLUÇÃO	W	X	Y	Z
BPM (Água) (A)	210	220	240	234
BPM (Solução) (B)	260	240	198	60
% Variação BPM [(B - A)/A] x 100	23,8%	9%	-17,5%	-74,4%
CLASSIFICAÇÃO	E	E	D	D