

Avaliação e modificação de microscópio alternativo para estruturação de laboratório de microbiologia e realização de atividades práticas na educação básica

RESUMO

Este estudo teve por objetivo modificar o microscópio alternativo de Yoshino (2017), que é composto por um aparador de acrílico que comporta uma lente plano-convexa e é associado a um smartphone, para permitir a visualização de microrganismos como leveduras e fungos filamentosos, bem como propor atividades práticas inéditas com esse equipamento, para que professores de Ciências e Biologia de Ensino Fundamental e Médio possam realizar atividades práticas de estudo de microrganismos em laboratório escolar. A principal modificação proposta consistiu na retirada de algumas das porcas metálicas do equipamento original para permitir maior aproximação do suporte de lâminas à lente de leitor de DVD, permitindo o ajuste de foco para lâminas contendo leveduras ou fungos filamentosos. O grau de magnificação alcançado foi determinado com lâmina de calibração para microscópio óptico, obtendo-se um aumento de 23 x (vezes) sem o uso de *zoom* digital da câmera do smartphone e de até 175 x na imagem final (capturada com *zoom* digital de 4 x da câmera somado ao aumento adicional observado na tela do computador quando a resolução da imagem era de 72 dpi). O microscópio modificado de Yoshino (2017) permitiu a observação da micromorfologia do fungo filamentoso *Botrytis cinerea* (mofo cinzento do morango), compatível com o observado em microscópio óptico convencional, bem como a observação da morfologia de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em suspensão aquosa de fermento biológico seco. Avaliou-se também o uso do microscópio modificado para correlacionar o efeito da concentração de açúcar do meio no aumento do diâmetro médio das bolhas de gás produzidas no processo de fermentação realizado pelo *S. cerevisiae*, ao longo de 3 minutos de gravação com câmera de smartphone de lâminas posicionadas no equipamento confeccionado. Conclui-se que o microscópio de Yoshino modificado constitui um modelo de microscópio alternativo que professores da Educação Básica poderiam utilizar para atividades práticas investigativas com microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Microscópio alternativo. Ensino. Microbiologia. Leveduras.

Amélia Sato

amelia.sato@escola.pr.gov.br
orcid.org/0000-0002-8750-6439
Secretaria de Estado da Educação do Paraná (SEED), Curitiba, Paraná, Brasil

Nicolle de Lima

nicolledelima123@gmail.com
orcid.org/0000-0001-5745-9363
Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil

Lucy Ono

lono@ufpr.br
orcid.org/0000-0002-6911-7261
Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil

INTRODUÇÃO

A importância do estudo dos microrganismos, e consequentemente da Microbiologia, é essencial para entender o seu impacto na vida humana. A relevância da compreensão dos microrganismos, invisíveis a olho nu e mesmo as técnicas que permitem visualizá-los se tornam, dessa forma, parte essencial da formação de um indivíduo, para que este possa compreender o mundo que o cerca e as interações realizadas com este mundo microscópico.

Embora o conhecimento de Microbiologia seja relevante para a compreensão de conteúdos como a origem da vida e sua evolução no planeta Terra, o tema é muitas vezes visto de maneira reducionista pelos estudantes do Ensino Fundamental e Médio (Albuquerque *et al.*, 2012), como se os microrganismos fossem apenas causadores de doenças, ignorando a sua imensa diversidade ou mesmo sua relevância na manutenção da vida na Terra.

A necessidade do professor de Ciências e/ou Biologia de se reinventar para proporcionar atividades práticas aos seus estudantes é antiga, e mesmo compreendendo que essas são essenciais na formação do estudante, os próprios docentes na sua formação universitária podem passar por carência de material e consequente formação deficitária. Define-se como atividade prática aquela que, por meio da experimentação, permite refletir e resolver problemas do cotidiano, vivenciando e compreendendo conceitos científicos de forma compartilhada (MARTINS; ARANTES, 2020). Sobral (2015) relata que, em muitas das escolas cujos licenciandos em Ciências Biológicas eram encaminhados, não havia laboratório de Ciências e os professores lá presentes quase não desenvolviam atividades práticas, limitando-se às aulas teóricas expositivas.

A discussão sobre a precarização das instituições de ensino atinge não somente as escolas de nível fundamental e médio como também as universidades. Barbosa e Barbosa (2010) comentam que o ensino da Microbiologia nas universidades também passa por uma renovação de metodologias, onde ferramentas alternativas de pesquisa são necessárias diante da carência de recursos financeiros para adquirir equipamentos de alto custo, e dentre as sugestões aparecem a autoclave na panela de pressão, estufas alternativas, meios de cultura alternativos, entre outros. Refletindo sobre a aplicação desses novos equipamentos alternativos, é possível conceber que eles também podem ser utilizados em escolas com o objetivo de despertar nos estudantes do Ensino Fundamental e Médio o interesse pelo mundo microscópico à medida que a aplicação de atividades práticas desenvolva a alfabetização científica, tão importante para a formação de cidadãos críticos.

A discussão acerca do uso de materiais alternativos em atividades práticas nas escolas é antiga. Axt e Moreira (1991) já relatavam o problema na década de 1990, todavia, ambos são críticos quanto ao entendimento do que é a necessidade do uso desses materiais, pois, sugerem que, ao mesmo tempo que o professor de Ciências não pode esperar por um laboratório bem equipado, também não deve ser constrangido a construir sempre um material alternativo remediando a falta de um equipamento que já existe. Os autores sugerem então que haja um equilíbrio entre a responsabilidade do poder público e da sociedade para com a escola e a responsabilidade do professor de buscar suprir os materiais necessários para a prática do ensino.

Barbêdo e Monerat (2014) comentam que o tema Microbiologia está presente nos livros didáticos com sugestões positivas de atividades práticas, todavia, a adequação dessas atividades no planejamento e até mesmo a reflexão sobre a sua relevância são papel do professor, e como existem fatores limitantes, como falta de recursos ou mesmo material laboratorial, alguns professores são bem-sucedidos na aplicação dessas e outros não. Barbosa e Oliveira (2015) também comentam que o ensino da Microbiologia é essencial para a formação do pensamento científico do aluno, sendo a atividade prática fundamental no processo, logo a busca por materiais alternativos é um desafio para o professor, mas que pode ser superado com esforço e criatividade.

As parcerias com outras instituições como as universidades são essenciais na formação do docente, Ovigli e Silva (2009) relatam uma parceria positiva entre universidade e escola pública com o intuito de renovar o ensino em Ciências, e que com a oferta de minicursos por licenciandos da universidade, os estudantes de escolas públicas puderam vivenciar atividades práticas relacionadas aos microrganismos. Da mesma maneira, Gitti *et al.* (2014) aplicaram a estudantes de escola pública materiais alternativos em atividades práticas de Microbiologia inicialmente pensadas para as universidades, como por exemplo, as estufas alternativas e meios de cultura alternativos como sugeridos por Barbosa e Barbosa (2010).

Este trabalho propõe aos professores de Ciências e Biologia a utilização do microscópio de Yoshino (2017) modificado, associado ao smartphone para o seu uso na realização de atividades práticas laboratoriais inéditas com leveduras e fungos filamentosos. Esse microscópio constitui uma alternativa viável às escolas que enfrentam o desafio de buscar recursos para equipar o seu laboratório de Ciências por ser um equipamento de fácil construção e manuseio, podendo atuar como estímulo à curiosidade do estudante.

MÉTODOS

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROSCÓPIO ALTERNATIVO DE LENTE PLANO-CONVEXA MODIFICADO E ASSOCIADO A SMARTPHONE

A construção de uma base de apoio para smartphone foi baseada no trabalho de Yoshino (2017), resumidamente, a metodologia originalmente proposta por Yoshino (2017) consiste em utilizar uma base de madeira quadrada acoplada a um apoio de acrílico transparente retangular para a lâmina a ser visualizada e possível de ser movimentado para cima e para baixo por meio de 2 parafusos franceses e de 2 porcas borboletas; e acima desse suporte para lâmina, uma outra placa de acrílico quadrada, essa sendo fixa por meio dos 2 parafusos citados anteriormente e de mais um 3º parafuso francês, que suporta a lente plano-convexa; a iluminação se dá por meio de uma minilanterna com 6 lâmpadas de LED.

As modificações do modelo construído neste trabalho foram relacionadas à troca da lente de *laser pointer* por lente de leitor de DVD, à retirada das porcas de suporte da placa de acrílico maior e à fixação dessa placa com o uso de massa adesiva acrílica epóxi, de modo a poder aproximar ainda mais o suporte de lâmina

da placa de acrílico onde a lente está acoplada, que se mostrou essencial para a observação de objetos menores como leveduras e fungos filamentosos.

Para a determinação quantitativa do grau de magnificação alcançado, foi utilizada uma lâmina de calibração de microscópio (Marca: ZZCAT, Modelo FHCW09.909 *Stage Microscope Slide*) com *zoom* digital de 4 x da câmera traseira do smartphone (Quantum MUV) associado ao microscópio modificado de Yoshino, (2017) em comparação com microscópio óptico de campo claro comercial (marca: Olen, objetivas de 10 x e 40 x, com aumento ocular de 10 x, aumento total de 100 x e 400 x, respectivamente).

Foram testadas para observação no microscópio modificado de Yoshino (2017) em comparação com microscópio óptico comercial, uma suspensão de leveduras (fermento biológico seco suspenso em solução de sacarose) em lâmina coberta com lamínula de vidro e fungos filamentosos de bolor de morango (*Fragaria* sp.) e de tangerina (*Citrus reticulata*), pela técnica de fita adesiva. Nessa técnica (Moraes *et al.*, 2009), um pedaço de fita adesiva foi cortada e colocada com a cola para baixo em contato com a colônia fúngica; após comprimir com um palito de dente para que os fungos filamentosos colem na fita, a fita foi colocada sobre uma gota de água depositada sobre a lâmina de vidro e foi recoberta com lamínula, sendo imediatamente observada no microscópio modificado de Yoshino (2017) com *zoom* digital de 4 x da câmera traseira do *smartphone* (Quantum MUV) e no microscópio óptico (objetivas de 10 x e 40 x, com aumento ocular de 10 x, aumento total de 100 x e 400 x, respectivamente), com imagens capturadas também com a câmera do *smartphone*.

SUGESTÃO DE ATIVIDADES PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA NO ENSINO MÉDIO UTILIZANDO MICROSCÓPIO ALTERNATIVO MODIFICADO

As atividades práticas avaliadas (inéditas utilizando o microscópio de Yoshino modificado) foram desenvolvidas a partir de questões norteadoras envolvendo o processo de fermentação induzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A 1ª questão norteadora a ser investigada seria: *Do que é feito o fermento biológico de pão?* Nesta etapa, os estudantes podem ser instigados a colherem informações do rótulo de embalagem do produto fermento biológico seco e realizarem buscas na internet sobre *Saccharomyces cerevisiae* (levedura). Para que consigam visualizar a levedura, os estudantes podem preparar uma suspensão do fermento biológico utilizando um copo de café, adicionando 1 colher de sopa de água mineral morna (~ 40°C) e 1 colher de chá de fermento biológico seco, misturando com palito de churrasco por 30 segundos; após 5 minutos, com o auxílio de um palito de dente (ou conta-gotas pequeno ou pipeta Pasteur), seria coletada e depositada em cima de uma lâmina de vidro o equivalente a 1 gota da suspensão e misturada sobre a lâmina com 1 ou mais gotas de água mineral (a suspensão deve ficar apenas levemente turva). Após cobrir a suspensão com lamínula de vidro e retirar o excesso das laterais da lamínula com papel toalha, a lâmina seria observada ao microscópio modificado de Yoshino (2017) com *smartphone* e *zoom* digital de pelo menos 4 x. Após realizarem a observação, pode-se pedir para os estudantes desenharem o que estão visualizando e depois mostrar fotografias de maior aumento desse microrganismo (aumento de 1000 x ou de microscopia eletrônica) e um desenho esquematizado dos seus constituintes.

Para visualizar microscopicamente a produção e crescimento de bolhas de gás por meio da fermentação do açúcar por leveduras utilizando o microscópio modificado de Yoshino (2017), foram preparadas sequencialmente 4 suspensões diferentes contendo ou não açúcar, contendo água morna (~ 40°C) e contendo fermento biológico seco ressuspensionado.

Para isso, foram utilizados 4 grupos experimentais, e para todos os grupos (~ 40°C), foram preparados:

- a) 1 copo de plástico pequeno (de café) contendo nenhuma colher de chá de açúcar (grupo 1); ou 0,5 colher de chá ou 1 colher de café de açúcar (grupo 2); ou 1 colher de chá de açúcar (grupo 3); ou 2 colheres de chá de açúcar (grupo 4) e solubilizados em 1 colher de sopa de água morna (~ 40 °C), preparados conforme orientação dos docentes;
- b) 1 copo de plástico pequeno (de café) contendo 1 colher de chá de fermento suspensa em 1 colher de sopa de água morna preparados conforme orientação dos docentes;
- c) lâminas, lamínulas, palitos de dentes, microscópio modificado de Yoshino (2017);
- d) 1 microscópio modificado de Yoshino (2017).

A avaliação seguiu os seguintes passos (caso haja apenas 1 microscópio, os preparos relacionados a cada grupo ou concentração de açúcar devem ser realizados sequencialmente e não simultaneamente):

Preparar o smartphone sobre o microscópio modificado de Yoshino (2017) com a câmera posicionada corretamente sobre a lente de DVD, ligando a lanterna e deixando o aparato pronto para receber a lâmina que será preparada. Esse ajuste inicial deve ser feito sem o *zoom* digital da câmera e observando a imagem da lente bem centralizada na tela. Aplicar o *zoom* digital (de pelo menos 4 x), preparar a câmera do smartphone no modo de gravação e sem bloqueio de tela, aguardando para iniciar a gravação após o posicionamento da lâmina; se possível, utilizar uma lâmina coberta com lamínula contendo uma suspensão aquosa do fermento biológico para pré-ajustar o foco, e para que depois a focalização dos grupos analisados seja facilitada;

Em um copo de café, adicionar a quantidade de açúcar correspondente ao grupo a ser estudado (0; 0,5 colher de chá ou 1 colher de café; 1 colher de chá; 2 colheres de chá) e solubilizar com 1 colher de sopa de água morna (~ 40°C), com agitação vigorosa usando palito de churrasco por 30 segundos;

Em um outro copo de café, adicionar 1 colher de chá de fermento biológico seco e ressuspender em 1 colher de sopa de água morna (~ 40°C), com agitação vigorosa por 30 segundos usando palito de churrasco; após o preparo dessa etapa, as seguintes devem ser imediatamente realizadas, para que as bolhas de gás estejam pequenas no momento de iniciar a gravação;

Imediatamente após o preparo da suspensão de leveduras, verter o copo contendo solução de açúcar sobre o copo contendo suspensão de leveduras e agitar com palito por 30 segundos, vigorosamente. Depositar imediatamente 1 ou 2 gotas sobre lâmina de vidro, coberta com lamínula e imediatamente posicionar e focalizar no microscópio modificado de Yoshino (2017). É muito importante

controlar essas variáveis para que o experimento seja reprodutível. Rapidamente escolher um campo onde bolhas de gases (4 ou mais) possam ser observadas e iniciar a gravação do campo por um período de 3 minutos;

Depois de finalizada a gravação, tirar *prints* das telas da gravação nos tempos de 0 e 3 minutos em cada uma das concentrações de açúcar, e após a impressão dessas telas, com o auxílio de uma régua milimetrada, medir os diâmetros das bolhas de gases de todas as telas. Para facilitar a escolha das bolhas a serem medidas, primeiramente identificar nos *prints* de telas retiradas aos 3 minutos aquelas que tenham 2 mm ou mais de diâmetro e depois verificar se há correspondência dessas bolhas nos mesmos locais (e com 2 mm ou mais de diâmetro) no tempo 0. O número de vezes em que cada bolha aumenta ao longo de 3 minutos será determinado pela relação “diâmetro da bolha aos 3 minutos/diâmetro da mesma bolha no tempo 0”. E uma média desse aumento será obtida pela “soma dos aumentos verificados/número de bolhas observadas”; pode-se construir também um gráfico de aumento médio do diâmetro da bolha x quantidade de açúcar ou tabelar os resultados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a construção do microscópio alternativo, foram feitas modificações no protocolo de Yoshino (2017): utilizando parafuso francês meia rosca (ao invés de rosca inteira, sugerido no protocolo), que foi o modelo que conseguimos encontrar facilmente para a compra; preenchendo o orifício que ficou levemente maior que o diâmetro da lente de DVD com fita adesiva para que a lente não ficasse caindo ao menor movimento do microscópio; removendo as porcas que originalmente iriam logo abaixo da placa de acrílico maior para poder aproximar o suporte de lâminas mais proximamente à lente. Nem todos os parafusos são facilmente encontrados para a compra e, ao se colocar rosca para segurar a placa de acrílico maior por baixo, objetos muito pequenos como leveduras e fungos filamentosos não podem ser visualizados, de modo que se verificou a necessidade de retirar essas peças para que a lâmina fosse aproximada ainda mais da lente.

As Figuras 1 e 2 mostram o passo a passo dessa construção, em grande parte direcionada pelo protocolo de Yoshino (2017), iniciando com a retirada da lente de DVD do aparato óptico para leitor de DVD (Figura 1a, 1b). Foi realizada marcação com caneta permanente na placa de MDF 20 x 20, com 2 pontos de interseção 2 x 2 cm (partindo dos vértices do quadrado) em um dos lados e no lado oposto, mais 1 ponto de interseção 2 x 10 cm (Figura 1c); prendeu-se 1 placa de acrílico 20 x 20 cm sobre a placa de MDF com o auxílio de fita adesiva, marcando novamente os 3 pontos na mesma posição encontrada na placa de MDF, sobre a folha de proteção das placas de acrílico (Figura 1c). Foram desenhadas 2 marcações na altura de 5 cm, uma em cada lado menor da placa retângula de acrílico de 10 x 20 cm e posicionada na mesma altura dos 2 pontos da placa de MDF (dessa forma, essa placa menor de acrílico ficou com 3 cm de sobra a partir da placa de MDF) e a placa de acrílico menor foi presa sobre a placa de acrílico maior com o auxílio de fita adesiva, fazendo novamente 2 marcações sobre a folha de proteção da placa de acrílico menor (Figura 1d, 1e, 1f, 1g). Com o auxílio de uma furadeira com broca de madeira (tamanho 8) conectada, foram feitos 2 furos nos locais marcados em um dos lados (a furadeira foi utilizada para furar simultaneamente a placa de madeira,

a placa de acrílico maior e a placa de acrílico menor); foi feito 1 furo no local marcado no lado oposto (a furadeira foi utilizada para furar simultaneamente a placa de MDF e a placa de acrílico maior); os 3 furos produzidos serviram para a passagem dos parafusos franceses; os furos foram produzidos com as placas ainda embaladas pela folha adesiva de proteção, de modo a evitar que a placa riscasse (dificultando a passagem da luz) ou quebrasse facilmente nos pontos em que foram furadas (Figura 1h). A placa de acrílico menor foi retirada e feita uma nova marcação no ponto 2 x 10 cm na placa de acrílico maior, sobre a folha adesiva de proteção (Figura 1). Na figura a seguir tem-se a parte I em que a, b) correspondem a lente de DVD; c) a marcação do MDF; d) o posicionamento da placa maior de acrílico; e, f, g) o posicionamento da placa menor de acrílico e marcação; h) a realização de furos nos locais marcados; e i) a retirada da placa de acrílico menor.

Figura 1 - Passo a passo da construção do microscópio modificado de Yoshino (2017)

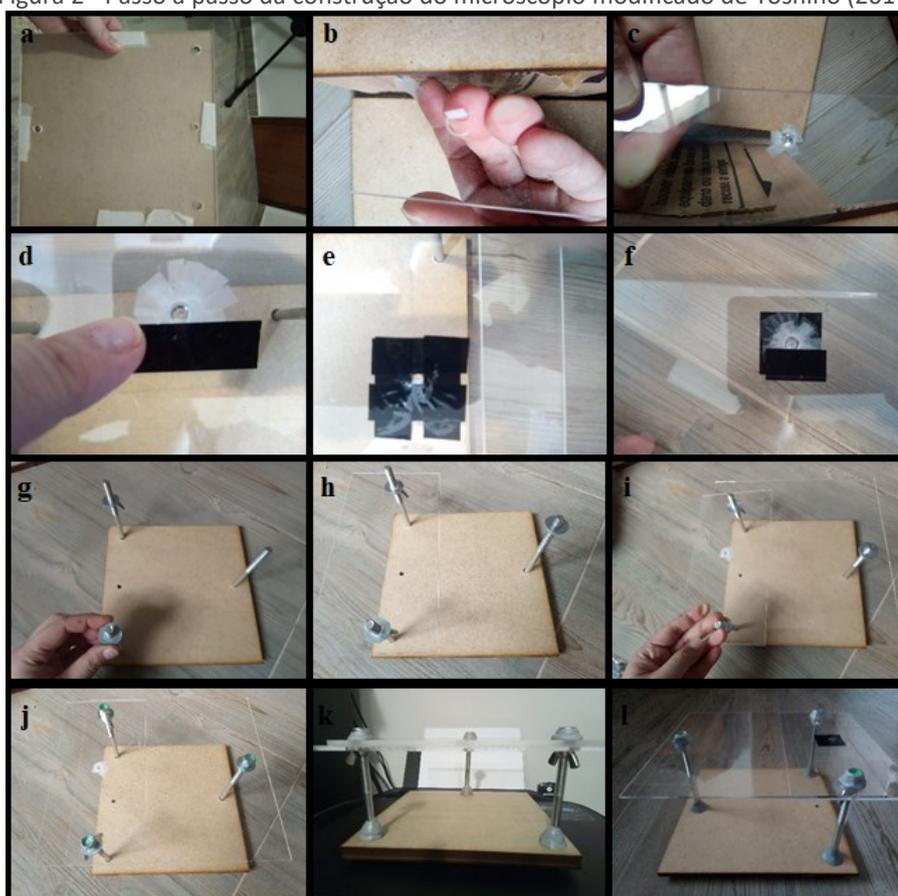


Fonte: Autoria própria (2019).

Posteriormente, com o auxílio de uma broca de madeira tamanho 5, foi feito um furo para permitir o encaixe da lente de DVD; uma broca de tamanho 5 para concreto foi passada na circunferência para aumentar o diâmetro do furo central, até que a lente conseguisse ser encaixada; as placas de MDF e acrílico maior foram separadas e o adesivo de proteção de ambas as placas de acrílico foi retirado (Figura 2a). Como a lente estava demasiado solta dentro do furo, foram colados pequenos pedaços de fitas adesivas conectando a face superior e a inferior da placa de acrílico; fez-se o encaixe da lente com a parte plana voltada para cima e a face convexa voltada para baixo (Figura 2b, 2c). Foram colados adesivos em torno da lente (na face superior e na face inferior da placa de acrílico) para tornar mais segura a sua fixação, deixando cerca de 1 mm do lado da fita em contato com a lente; foram passados os 3 parafusos franceses pela placa de MDF; rosqueadas as 2 porcas borboletas em um dos lados e 1 porca sextavada no lado oposto; colocadas 3 arruelas nos parafusos franceses (Figura 2d, 2e, 2f, 2g). A placa de acrílico menor foi acomodada, passando pelos 2 parafusos franceses em 1 dos

lados (Figura 2h). A placa de acrílico maior foi acomodada, passando pelos 3 parafusos franceses (Figura 2i) e foram conectadas 3 porcas *Nylon* baixas nos parafusos franceses (Figura 2j). As placas de acrílico foram elevadas, girando as 2 porcas borboletas e a porca sextavada, até que ficassem firmemente rentes à porcas *Nylon*; utilizou-se a massa adesiva epóxi para prender firmemente os parafusos franceses à base de MDF e também para prender as porcas *Nylon* à superfície superior da placa de acrílico maior (Figura 2k). Após 48 horas, com a massa adesiva já bem seca, giraram-se as porcas borboletas para baixar a placa de acrílico menor (suporte para as lâminas) (Figura 2l). Na parte II da construção do microscópio tem-se a) confecção de furo para o encaixe da lente de DVD; b, c) colagem de adesivo para diminuir o diâmetro do furo de encaixe da lente; d, e, f) fixação da borda da lente com adesivo; g) inserção dos parafusos franceses, porcas borboletas, porca sextavada e arruelas; h) acomodação da placa de acrílico menor; i) acomodação da placa de acrílico maior; j) conexão das porcas *Nylon*; k) placas de acrílico rentes à porcas *Nylon* e utilização de massa adesiva epóxi para prender os parafusos franceses e porcas *Nylon*; l) placa de acrílico menor abaixada após 48 horas de secagem da massa adesiva.

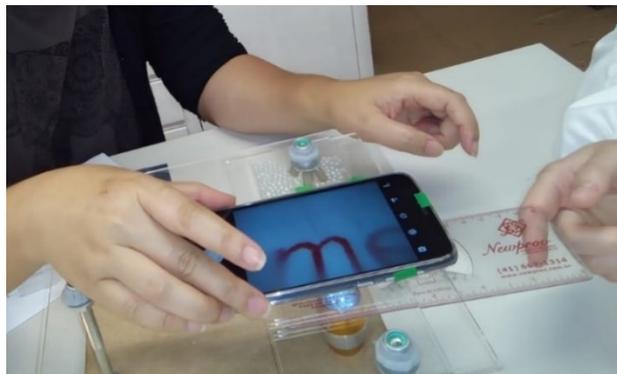
Figura 2 - Passo a passo da construção do microscópio modificado de Yoshino (2017)



Fonte: Autoria própria (2019).

A Figura 3 mostra o smartphone posicionado sobre o microscópio de Yoshino (2017) modificado. Os materiais utilizados para a montagem são descritos na Tabela 1, e o custo de confecção que foi de R\$ 75,00, está bem abaixo dos menores valores (em torno de R\$ 1.400,00) observados para microscópio óptico convencional (cerca de 5 % do valor de um microscópio convencional mais barato).

Figura 3 - Smartphone sendo ajustado sobre o aparador de acrílico e objeto (régua) sendo colocado no suporte para lâminas (placa retangular intermediária)



Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 1 – Itens para confecção do microscópio de Yoshino (2017) modificado para visualização de leveduras e fungos filamentosos

Item	Quantidade
Chaveiro lanterna com 6 LEDs, tamanho 5 cm x 3 cm, modelo GT0247	1
Unidade Ótica <i>Laser</i> Samsung Soh-dl6 DI6 DVD Sd7050	1
Placa de acrílico cristal 2 mm de espessura, 20 x 20 cm	1
Placa de acrílico cristal 2 mm de espessura, 10 x 20 cm	1
Chapa Placa Madeira MDF Cru 3 mm 20 x 20 cm	1
Parafuso Francês com Porca UNC 5/16" X 4.1/2" Classe 5.8 Ferro Zincado Branco	3
Arruela Lisa 5/16" (8.6 x 21 x 1.2) Aço Carbono Zincado (Trivalente)	3
Porca Borboleta UNC 5/16" - 18 Chave Inox 304/A2 Passivado	2
Porca <i>Nylon</i> Baixa UNC 5/16" - 18 Chave 1/2" Ferro Zincado Branco	3
Porca Sextavada Torque UNC 5/16" - 18 Chave 1/2" Zincado Branco	1
Massa adesiva epóxi Durepoxi Loctite	50g

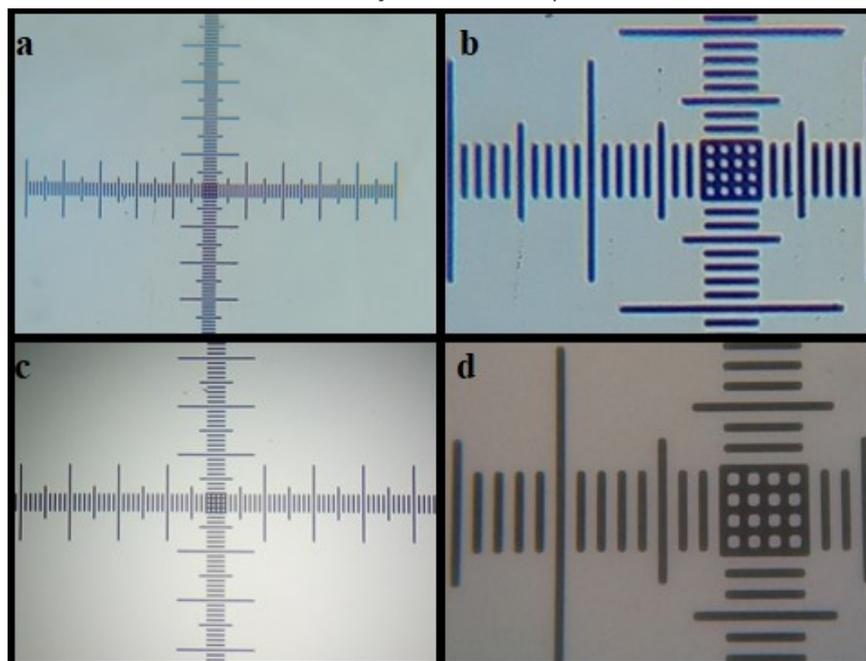
Fonte: Autoria própria (2019).

O microscópio modificado de Yoshino (2017) teve seu grau de magnificação avaliado quantitativamente utilizando lâmina de calibração de microscópio (Figura 4). Para o cálculo da magnificação alcançada após observação da imagem obtida em tempo real na tela do smartphone ao observar o desenho da lâmina de calibração, sabendo que cada divisão do desenho observado equivale a 0,010 mm ou 10 micrômetros, com o auxílio de uma régua foram medidas as distâncias de 10 traços ou divisões (equivalentes a 0,1mm ou 100 micrômetros) ou de múltiplos desses, após o objeto ter sido aumentado (Tabela 2, 3ª coluna). O aumento observado foi calculado pela relação do comprimento em milímetros da imagem aumentada pelo microscópio/comprimento real de 0,1mm.

A medição também foi realizada para as imagens das fotografias de 72 dpi de resolução (Figura 4, imagens com mais de 1 Mb de tamanho) quando elas foram copiadas diretamente para o programa de edição de texto Word, e selecionando apenas o campo desejado com a ferramenta de imagem desse programa "formatar" e "cortar", que promove o corte sem alterar o tamanho do objeto

visualizado dentro da fotografia (Tabela 2, 4ª coluna). As imagens a, b, c e d da figura são respectivamente: microscópio modificado de Yoshino com smartphone sem *zoom* digital, magnificação ~ 40 x; microscópio modificado de Yoshino com smartphone com *zoom* digital de 4 x, magnificação ~ 170 x; microscópio óptico com objetiva de 10 x e ocular de 10 x, magnificação de ~ 61 x; e microscópio óptico com objetiva de 40 x e ocular de 10 x, magnificação de ~ 265 x.

Figura 4 - Determinação do grau de magnificação do microscópio modificado de Yoshino (2017) e comparação como microscópio óptico convencional utilizando lâmina de calibração de microscópio



Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 2 - Quantificação da magnificação de objetos pelo microscópio modificado de Yoshino (2017) e microscópio óptico convencional utilizando lâmina de calibração

Aparato avaliado	Equivalência em mm de 0,1 mm da lâmina	Aumento na tela do smartphone	Aumento na tela do computador (72 dpi)
Microscópio óptico (objetiva de 10 x, ocular de 10 x)	2,6	26 x	61 x
Microscópio óptico (objetiva de 40 x, ocular de 10x)	11,0	110x	265 x
Microscópio modificado de Yoshino (câmera do smartphone sem <i>zoom</i>)	2,3	23 x	41 x
Microscópio modificado de Yoshino (câmera do smartphone, <i>zoom</i> 4 x)	8,7	87 x	175 x
Microscópio óptico (objetiva de 10 x, ocular de 10 x)	2,6	26 x	61 x

Fonte: Autoria própria (2019).

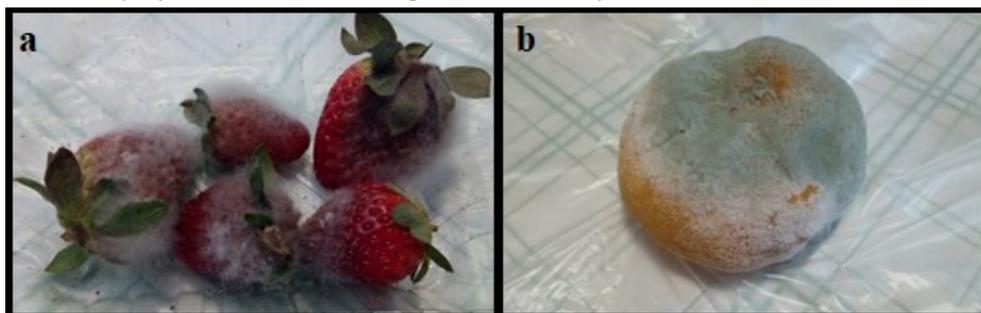
Observou-se que a captura de imagem visualizada no microscópio óptico utilizando o smartphone gerou imagem menor do que a visualizada diretamente pelo observador pela lente ocular do mesmo. De acordo com as medidas da imagem da lâmina de calibração, no aumento de 100 x (objetiva de 10 x e ocular de 10 x), a fotografia tirada com o smartphone levou a um aumento de 61 x, ou seja, na fotografia, o objeto apareceu com apenas 61 % do tamanho visualizado diretamente ao microscópio óptico; já no aumento de 400 x (objetiva de 40 x e ocular de 10 x), a fotografia tirada com o smartphone levou a um aumento de 265 x, ou seja, na fotografia, o objeto apareceu com apenas 66 % do tamanho visualizado diretamente ao microscópio óptico (Tabela 2).

A escolha do material mais adequado para uma aula experimental é relevante quando consideramos os materiais alternativos e sua aplicabilidade. A lente plano-convexa usada em leitores de DVD acoplada ao aparador de acrílico poderia atingir uma magnificação de 100 x segundo Yoshino (2017). Após o teste com a lâmina de calibração do microscópio constatou-se que a magnificação observada na tela do smartphone, com um *zoom* de 4 x era próxima de 87 x, um resultado próximo ao relatado por Yoshino (2017).

Sepel *et al.* (2011) relatam que essas lentes (DVD, *laser pointer*, *webcam*) possuem curvaturas variadas que interferem na distância focal e no grau de magnificação de objetos, podendo ser utilizadas na observação de estruturas microscópicas de diferentes magnitudes.

O microscópio modificado de Yoshino (2017) também foi avaliado aqui para a visualização de fungos filamentosos em lâminas preparadas sobre água com fitas adesivas que foram aderidas a mofos encontrados em frutas como morango (*Fragaria sp.*) e tangerina (*Citrus reticulata*) (Figura 5), em comparação com o microscópio óptico.

Figura 5 – Morango (*Fragaria sp.*) e tangerina (*Citrus reticulata*) mofados, utilizados para o preparo de lâminas de fungos filamentosos pela técnica da fita adesiva

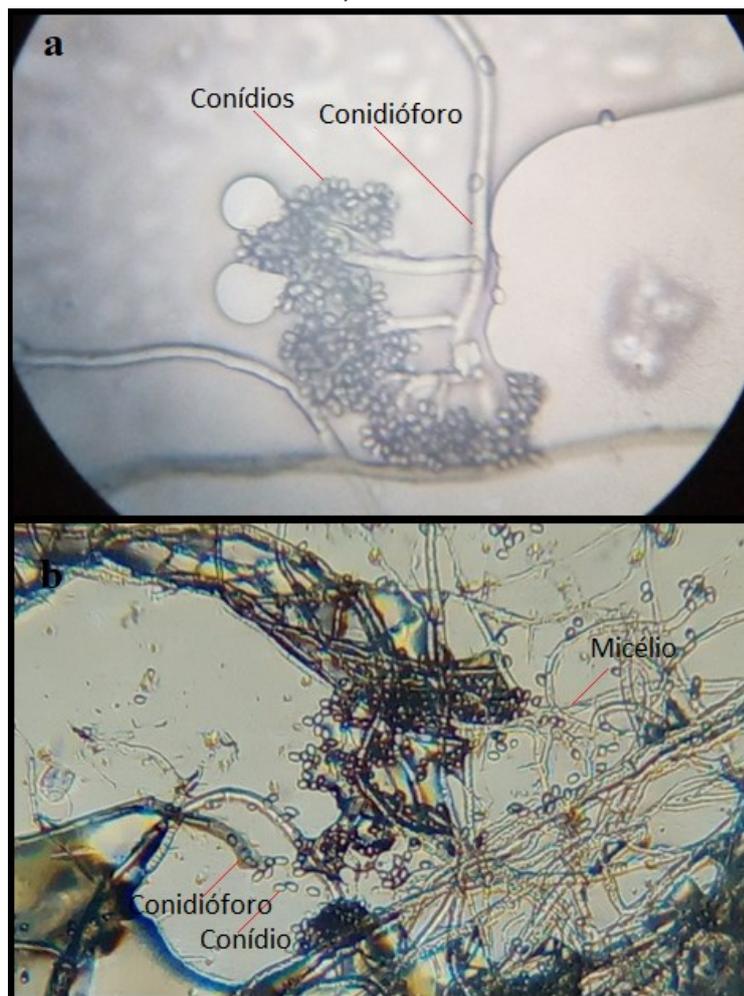


Fonte: Autoria própria (2020).

O mofo crescido sobre o morango tinha coloração branco-acinzentada e crescimento algodonoso, aspecto comumente observado em crescimento de *Botrytis cinerea*, cuja micromorfologia observada em microscópio óptico com objetiva de 40 x e ocular de 10 x é compatível com essa espécie. Embora a observação de um campo de visualização adequado seja mais difícil de ser encontrado no microscópio modificado de Yoshino (devido à ausência de um *charriot* para a movimentação da lâmina), dedicando-se mais tempo à procura, imagens como a da Figura 6 com a observação do micélio com hifas ramificadas, conidióforos ramificados no ápice e conídios terminais ovalados compatíveis com

os descritos por Silva (2014) puderam ser obtidas. Na figura a seguir “a” representa a lâmina obtida pela técnica da fita adesiva, em água, observação em microscópio óptico com objetiva de 40 x e ocular de 10 x, magnificação de 400 x, aumento calculado de cerca de 260 x nesta imagem; e “b” a lâmina obtida pela técnica da fita adesiva, em água, observação em microscópio modificado de Yoshino, captura da câmera traseira de smartphone com zoom digital de 4 x, magnificação calculada de cerca de 170 x nesta imagem.

Figura 6 - Fungo observado em mofo de morango com micromorfologia compatível com *Botrytis cinerea*

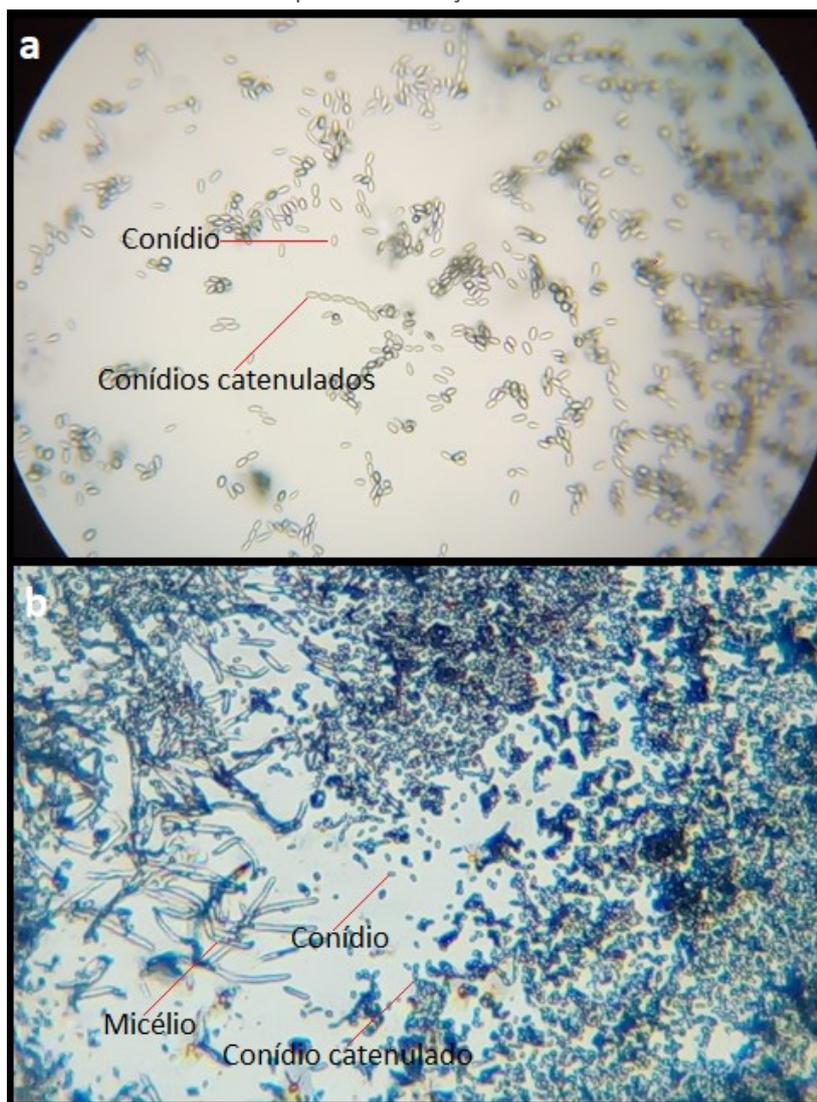


Fonte: Autoria própria (2020).

O mofo crescido sobre a tangerina tinha coloração verde, com crescimento pulverulento, aspecto comumente encontrado em *Penicillium* sp. cuja observação no microscópio modificado de Yoshino (2017) em lâminas com gota de água (Figura 7) ou com o corante azul de algodão empregado para coloração de fungos hialinos ou sem cor (Figura 8) permitiram apenas a observação dos conídios (alguns na forma catenulada, em cadeia) e não permitiram a visualização de conidióforos ramificados perto da base (GOULART, 2005). Os conídios de *Penicillium digitatum* são cilíndricos a ovalados e catenulados devido ao crescimento em cadeia. Já a observação ao microscópio óptico, utilizando o corante azul de algodão, objetiva de 40 x e ocular de 10 x (Figura 8), foi possível observar os conidióforos compatíveis

com o gênero *Penicillium* sp. Na figura a seguir tem-se a) lâmina obtida pela técnica da fita adesiva, em água, observação em microscópio óptico com objetiva de 40 x e ocular de 10 x, magnificação de 400 x, aumento calculado de cerca de 260 x; e b) lâmina obtida pela técnica da fita adesiva, em água, observação em microscópio modificado de Yoshino, captura da câmera traseira de smartphone com zoom digital de 4 x, magnificação calculada de cerca de 170 x.

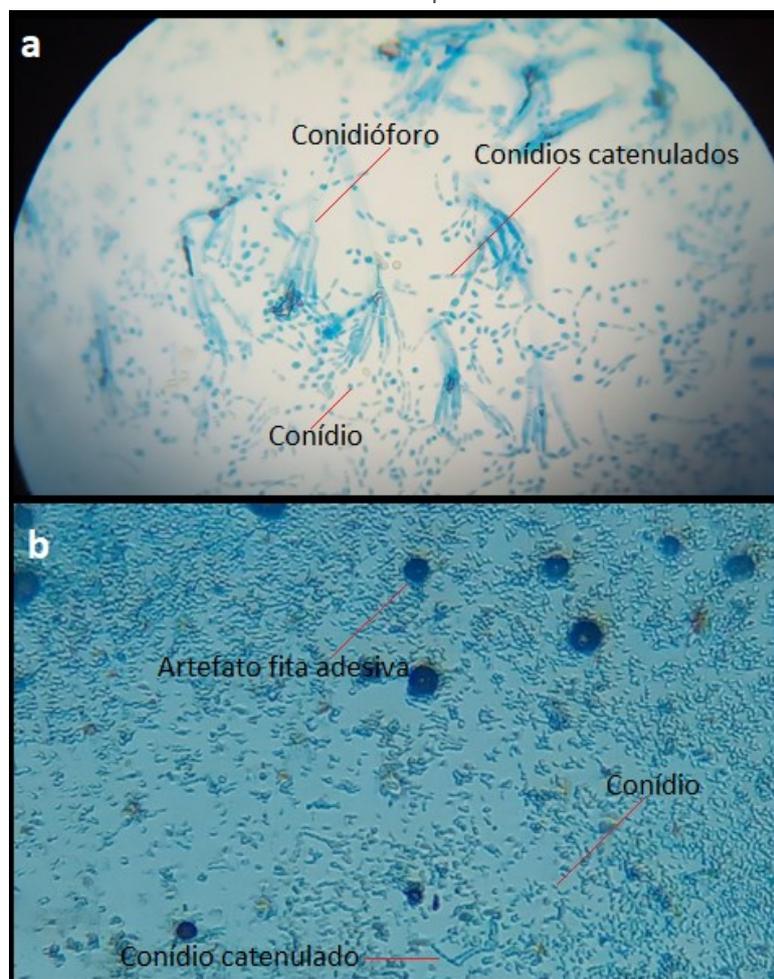
Figura 7 - Fungo observado em mofo de tangerina com micromorfologia não suficiente para identificação



Fonte: Autoria própria (2020).

Na figura 8 apresentada a seguir “a” representa a lâmina obtida pela técnica da fita adesiva, em corante azul de algodão (lactofenol), observação em microscópio óptico com objetiva de 40 x e ocular de 10 x, magnificação de 400 x, aumento calculado de cerca de 260 x nesta imagem; e b) lâmina obtida pela técnica da fita adesiva, em água, observação em microscópio modificado de Yoshino, captura da câmera traseira de smartphone com zoom digital de 4 x, magnificação calculada de cerca de 170 x nesta imagem.

Figura 8 - Fungo observado em mofo de tangerina com micromorfologia compatível como *Penicillium* sp



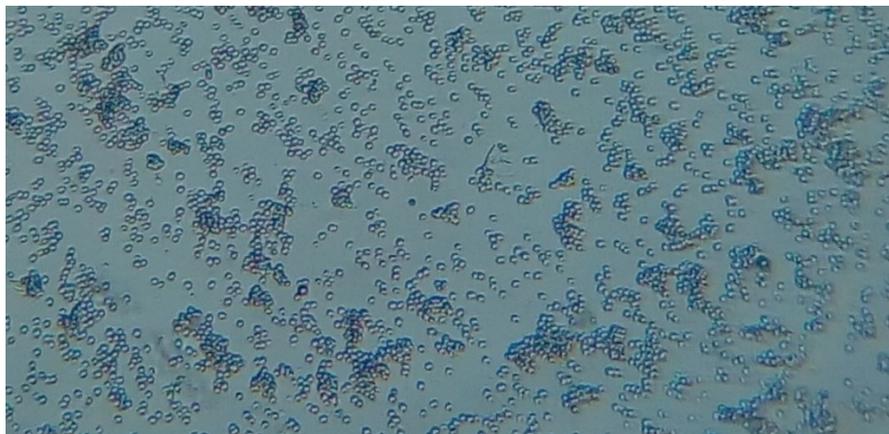
Fonte: Autoria própria (2020).

O microscópio de Yoshino (2017) modificado foi avaliado para a realização de atividades práticas utilizando fermento biológico (leveduras *Saccharomyces cerevisiae*), considerado material de fácil acesso e não patogênico durante o manuseio tanto ao professor quanto aos estudantes. Quando a suspensão dessas leveduras foi fixada em lâmina e corada com solução de violeta de genciana na expectativa que ficassem mais evidentes, portanto facilitasse sua visualização, notou-se que esses microrganismos ficaram mais evidentes quanto à forma quando observados à fresco, tendo sido possível observar sua estrutura unicelular com certa nitidez.

Os estudantes teriam uma 1ª questão norteadora a ser investigada “Do que é feito o fermento biológico de pão?” que resultaria no convite à observação de uma suspensão aquosa do fermento biológico seco contendo células microscópicas de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura), utilizando o microscópio modificado de Yoshino (2017) (Figura 9). Para essa observação, foi importante produzir uma gota levemente turva antes da adição da lamínula, pois suspensões muito concentradas e turvas podem dificultar a observação da levedura. Seria importante que nessa etapa, os estudantes já tivessem tido aulas anteriores para a observação de

diferentes objetos ampliados pelo microscópio e tivessem familiaridade com o funcionamento dele.

Figura 9 - Observação de suspensão aquosa de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de fermento biológico seco em microscópio modificado de Yoshino (2017). A captura da imagem foi feita com câmera traseira de smartphone com *zoom* digital de 4 x; a magnificação calculada é de cerca de 170 x nesta imagem



Fonte: Aatoria própria (2020).

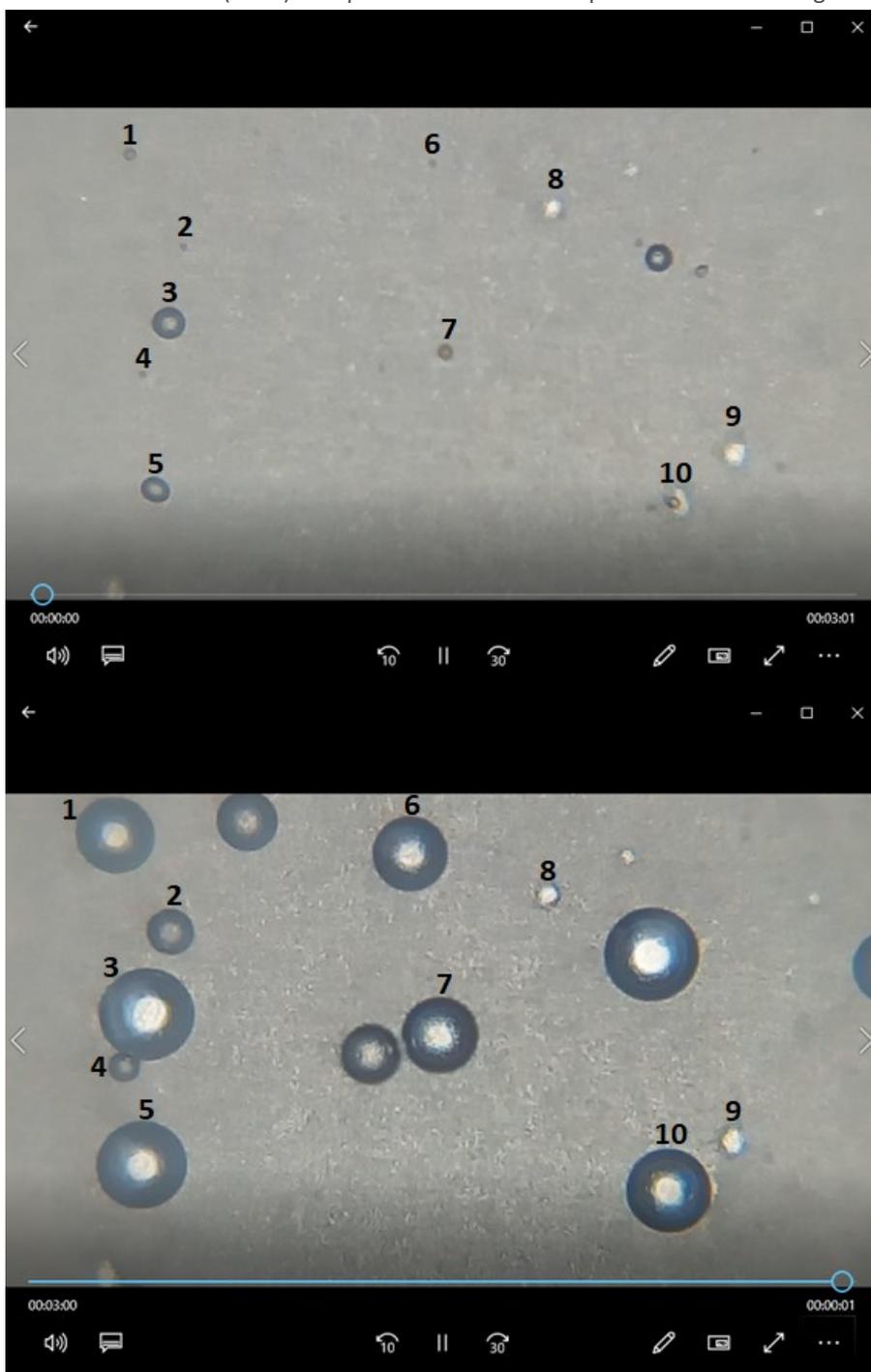
Além da modificação proposta neste trabalho para o microscópio de Yoshino (2017) ter permitido a observação de leveduras a fresco, permitiu também de forma inédita a proposição de uma atividade para a correlação entre a concentração de açúcar e a produção de gás pela levedura *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação do açúcar. As avaliações dos crescimentos das bolhas de gás (pela medida do diâmetro médio das bolhas nas imagens obtidas pela filmagem com a câmera do smartphone nos tempos zero e 3 minutos nos grupos de 0 e 1 colher de chá de açúcar) produzidas são apresentadas nas Figuras 10 e 11 e também nas Tabela 3 e 4. Nesse experimento é possível observar que a velocidade de crescimento das bolhas de gás resultantes da fermentação da sacarose pelas leveduras aumenta com o aumento da concentração de açúcar, mas até um limite no qual concentrações muito altas de açúcar levam a diminuição na velocidade de fermentação, possivelmente influenciado por um ambiente hipertônico para o microrganismo. Para que os resultados sejam confiáveis, reforça-se a orientação de que todas as demais variáveis sejam cuidadosamente controladas (como a quantidade de fermento biológico seco, a temperatura da água, o tempo de adição de cada um dos componentes, tempo de início de gravação do experimento nos diferentes grupos e tempo entre cada um dos preparos).

Figura 10 - Avaliação do aumento do diâmetro das bolhas de gás produzidas por suspensão aquosa de leveduras sem adição de açúcar em microscópio modificado de Yoshino (2017) com *prints* de telas nos tempos 0 e 3 minutos de gravação



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 11 - Avaliação do aumento do diâmetro das bolhas de gás produzidas por suspensão aquosa de leveduras contendo 1 colher de chá de açúcar em microscópio modificado de Yoshino (2017) com *prints* de telas nos tempos 0 e 3 minutos de gravação



Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 3 – Aumento médio do diâmetro das bolhas de gás produzidas por suspensão aquosa de leveduras contendo diferentes quantidades de açúcar (0 e 0,5) em *prints* de telas de 0 e 3 minutos de gravação em microscópio modificado de Yoshino (2017)

Bolha	0 colher de chá de açúcar			0,5 colher de chá de açúcar		
	3 min (mm)	0 min (mm)	Aumento (vezes)	3 min (mm)	0 min (mm)	Aumento (vezes)
1	5	4	1,3	16	4	4,0
2	4	4	1,0	5	4	1,3
3	5,5	5	1,1	14	4	3,5
4	6	5	1,2	14	3,5	4,0
Aumento Médio	1,1x			3,2x		

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 4 – Aumento médio do diâmetro das bolhas de gás produzidas por suspensão aquosa de leveduras contendo diferentes quantidades de açúcar (1 e 2) em *prints* de telas de 0 e 3 minutos de gravação em microscópio modificado de Yoshino (2017)

Bolha	1 colher de chá de açúcar			2 colheres de chá de açúcar		
	3 min (mm)	0 min (mm)	Aumento (vezes)	3 min (mm)	0 min (mm)	Aumento (vezes)
1	13	2	6,5	21	11	1,9
2	8	1	8,0	17	8	2,1
3	17	6	2,8	11	6	1,8
4	5	1	5,0	5	3,5	1,4
5	16	5	3,2	13	6,5	2,0
6	13	1	13,0	11	5	2,2
7	13	2,5	5,2			
8	4	4	1,0			
9	5	4	1,3			
10	15	2	7,5			
Aumento Médio	5,3x			1,9x		

Fonte: Autoria própria (2020).

Freitas *et al.* (2015) propuseram a construção do microscópio de Yoshino (2017) associado ao smartphone a 11 licenciandos em Ciências Biológicas, sendo que 6 já atuavam como professores de Ciências ou Biologia. O objetivo era levantar as impressões dos estudantes universitários com mais experiência no manuseio de equipamentos da área microbiológica sobre o que ele denominou de “smartscópio” e os estudantes a consideraram como ferramenta adequada e promissora para o uso em escolas públicas. Na mesma linha, Silva *et al.* (2017) propuseram a construção de microscópio semelhante ao de Yoshino (2017) com a utilização de lente retirada de leitor de DVD, todavia, as placas de acrílico foram substituídas por capas reutilizadas de CD e o ajuste de foco retirado de um binóculo militar esportivo com alcance de mil metros, dessa maneira foi possível observar em um smartphone protozoários, nematoides e ácaros.

Outros pesquisadores como Boszko (2018), observaram que os próprios estudantes poderiam atuar como jovens cientistas investigativos quando era proposto a eles que criassem o seu próprio microscópio após um prévio relato histórico dos métodos utilizados por pesquisadores como Hooke e Leeuwenhoek. Foram distribuídos então materiais alternativos, como caixa de papel, cola, tesoura, fita adesiva, seringa e uma garrafa pet e o *laser pointer*, incluindo também protozoários para observação. A atividade prática, realizada em forma de oficina produziu uma diversidade de microscópios construídos segundo a imaginação e criatividade dos estudantes, enriquecendo a aula prática experimental.

Em outro projeto aplicado a estudantes universitários da área biológica, Wallau *et al.* (2008) observaram que 48,3% dos calouros que participaram desse estudo nunca tinham tido contato com um microscópio e o restante só tinham tido contato uma vez ou outra sem a possibilidade de manuseio pela escassez do equipamento nas instituições de ensino. Entende-se que a produção de ferramentas didáticas alternativas também é importante na formação do estudante da área da Biologia que queira seguir a carreira da docência.

Dessa maneira, as modificações propostas neste trabalho para o microscópio de Yoshino (2017), bem como as atividades propostas para a observação do *S. cerevisiae* e do processo de fermentação com produção de gás (e sua dependência da concentração de açúcar do meio), aparecem como alternativas para possibilitar ao professor de Biologia e Ciências a inserção de atividades práticas para o aprendizado da Microbiologia. As atividades propostas podem ser incluídas em uma sequência didática, iniciando com a observação de leveduras, que são microrganismos de fácil obtenção e manuseio. Essas atividades poderiam ser utilizadas para aguçar a curiosidade dos estudantes e ao mesmo tempo auxiliá-los na compreensão do papel de microrganismos em seu cotidiano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da pesquisa permitiram a seleção do fermento biológico como material adequado para a realização de uma atividade prática cujo objetivo é a observação de microrganismos utilizando o microscópio de Yoshino modificado. A lente plano-convexa utilizada em leitores de DVD mostrou-se efetiva na observação de leveduras a fresco, demonstrando que o grau de magnificação em torno de 87 x (com o *zoom* digital de 4 x) e de cerca de 175 x nas imagens fotografadas com resolução de 72 dpi, associados à nitidez apresentada pela lente, são suficientes para a observação de alguns fungos filamentosos, leveduras e de bolhas de gases produzidos pela fermentação de açúcares por leveduras.

A avaliação do aparador de acrílico que tem como objetivo dar estabilidade ao foco do smartphone, permitindo assim maior nitidez à imagem vista pela câmera, também se mostrou de acordo com o proposto. Por fim, o microscópio de Yoshino modificado e confeccionado com materiais alternativos mostrou-se adequado, sugerindo-se o seu uso em atividades práticas com microrganismos em escolas de Ensino Fundamental e Médio. Ressalta-se que as atividades práticas associadas a uma sequência didática enriquecem a aula, permitindo ao professor desenvolver os vários conceitos relacionados à Microbiologia de forma investigativa.

Alternative microscope evaluation and adjustment in order to restructure a microbiology laboratory and perform practical activities in basic education

ABSTRACT

The aim of this study was to modify the Yoshino's alternative microscope (2017) structured by an acrylic support containing plan-convex lens attached to a smartphone device. This design allows the viewing of microorganisms such as yeasts and filamentous fungi while offering new practical activities at the same time. That way, Science and Biology teachers in Elementary and High School will be able to develop practical activities to study microorganisms within a school laboratory. The main alteration proposed was to remove some of the nuts from the original equipment in order to permit a higher proximity of the blades holder to the DVD reader lens, allowing the better focus adjustment to see the morphology of yeasts and filamentous fungi. The magnification degree achieved was determined with a calibration blade for optical microscopes, obtaining a 23x (times) magnification with no use of digital zoom from the smartphone camera and up to 175x for the final image (captured with camera digital zoom 4x amplified by the laptop screen with 72 dpi resolution image). The modified Yoshino's microscope (2017) allowed seeing the micromorphology of the filamentous fungus *Botrytis cinerea* (strawberry's gray mold), similar to that observed in a conventional optical microscope. It also enabled to see the morphology of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in aqueous suspension of dry biological ferment. The performance of the modified microscope was also assessed to compare the sugar effect concentration in the medium on increasing the gas bubbles average diameter produced by *S. cerevisiae*, recording for 3 minutes the blades placed above the built equipment with smartphone camera. The conclusion was that the modified Yoshino's microscope is a model of an alternative microscope that teachers in Basic Education could use to make practical investigative classes with microorganisms.

KEYWORDS: Alternative microscope. Teaching. Microbiology. Yeasts.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro ao PROFBIO – Programa de Mestrado Profissional em Ensino de Biologia em Rede Nacional.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, G.G.; BRAGA, R.P.S.; GOMES, V. Conhecimento dos alunos sobre microrganismos e seu uso no cotidiano. **Revista de Educação, Ciências e Matemática**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 58-68, 2012.
- AXT, R.; MOREIRA, M.A. O ensino experimental e a questão do equipamento de baixo custo. **Revista de Ensino de Física**, São Paulo, v. 13, p. 97-103, 1991.
- BARBÊDO, G.T.; MONERAT, C.A.A. Microbiologia no ensino fundamental: como os livros didáticos abordam essa temática. **Ensino, Saúde e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.
- BARBOSA, F.H.F.; BARBOSA, L.P.J.L. Alternativas metodológicas em Microbiologia- viabilizando atividades práticas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Aracaju, v. 10, n. 2, p. 134-143, 2010.
- BARBOSA, F.G.; OLIVEIRA, N.C. Estratégias para o Ensino de Microbiologia: uma Experiência com Alunos do Ensino Fundamental em uma Escola de Anápolis-GO. **Científica Ciências Humanas e da Educação**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 5-13, 2015.
- BOSZKO, C. Microscópios com materiais alternativos: Uma proposta para o Ensino da Microbiologia. *In*: III Mostra Gaúcha de Produtos Educacionais, 2018, Passo Fundo - RS. **Anais [...]**. Passo Fundo - RS, 2018.
- FREITAS, F.; NAGEM, R.; BONTEMPO, G. Contribuições e desafios de um modelo análogo ao microscópio óptico baseado em smartphone para o ensino de Ciências. *In*: X Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências – X ENPEC, 2015, Águas de Lindóia - SP. **Anais [...]**. Águas de Lindóia – SP, 2015.
- GITTI, V.L.; SOUZA, M.P.; DIAS, A.P.M., LACERDA, F.K.D. Aprendendo com os microrganismos: uma proposta prática. **Ensino, Saúde e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.
- GOULART, A.C.P. **Fungos em Sementes de Soja - Detecção, Importância e Controle**, Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005, 72 f.
- MARTINS, I. F.; ARANTES, S. L. F Concepções de professores de ciências biológicas sobre as aulas práticas. **ACTIO**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 1-20, set./dez. 2020.
- MORAES, A.M.L.; PAES, R.A.; HOLANDA, V.L. Micologia. *In*: **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 4, p. 399-496, Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009.

OVIGLI, D.F.B.; SILVA, E.B. Microrganismos? Sim, na saúde e na doença! Aproximando universidade e escola pública. *In: Simpósio Nacional de Ensino de Ciência e Tecnologia, Curitiba – PR. Anais [...], v. 1, 2007, p. 396-416, Curitiba – PR, 2009.*

SEPEL, L.M.N.; ROCHA, J.B.T.; LORETO, E.L.S. Construindo um microscópio II. Bem simples e mais barato. **Revista Genética na Escola**, Ribeirão Preto, v. 6, p. 1-5, 2011.

SILVA, V.M. **Atividade antagônica de actinobactérias contra *Botrytis sp.*** 2014. 38 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVA, C.E.P.; MORAIS, T.L.; FREITAS, J.R.S. Microscópio caseiro: uma alternativa para a melhoria do ensino de citologia nas escolas com ausência de laboratório de Ciências. *In: IV Congresso Nacional de Educação - IV CONEDUR, 2017, João Pessoa – PB. Anais [...]. João Pessoa – PB, 2017.*

SOBRAL, M.S.C. **Relevância dos laboratórios de aulas práticas na formação inicial de professores de ciências e biologia.** 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências: Química da Vida e Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

YOSHINO, K. Making science more accessible: DIY smartphone conversion brings microscopy to the masses. **International Journal on Innovations in Online Education**, v. 1, n. 1, p. 83-91, 2017.

WALLAU, G.L.; ORTIZ, M.F.; RUBIN, P.M.; LORETO, E.L.S.; SEPEL, L.M.N. Construindo um microscópio, de baixo custo que permite observações semelhantes às dos primeiros microscopistas. **Revista Genética na Escola**, Ribeirão Preto, v. 3, p. 1-3, 2008.

Recebido: 09 set. 2020

Aprovado: 30 mar. 2021

DOI: 10.3895/actio.v6n1.3527

Como citar:

SATO, A.; LIMA, N. de; ONO, L. Avaliação e modificação de microscópio alternativo para estruturação de laboratório de microbiologia e realização de atividades práticas na educação básica. **ACTIO**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 1-22, jan./abr. 2021. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/actio>>. Acesso em: XXX

Correspondência:

Lucy Ono

Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Rua Francisco H. dos Santos, n. 100, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brasil.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

