



CLASSIFICANDO ABELHAS

Maria Cristina Arias, Flávio de Oliveira Francisco, Lyria Mori e Cristina Yumi Miyaki

mcarias@ib.usp.br

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Resumo

A atividade – Classificando Abelhas – simula os procedimentos experimentais e os resultados obtidos em um estudo científico com abelhas brasileiras sem ferrão. São comparadas abelhas originárias de duas localidades diferentes (Estado de São Paulo e Estado do Paraná), classificadas como sendo da mesma espécie por meio de critérios morfológicos. A análise do DNA mitocondrial é empregada nessa comparação. São simuladas digestões do DNA com quatro enzimas de restrição para verificação de diferenças no padrão de corte e número de fragmentos gerados. Os fragmentos são separados numa simulação de eletroforese e os padrões de corte para cada enzima são comparados entre as abelhas do experimento. Os resultados mostram claramente que, embora pertencentes à mesma espécie, as abelhas apresentam marcas moleculares distintas, indicando que podem constituir unidades evolutivas e biológicas diferentes.

Marcadores moleculares: aplicação e importância

Vivemos na era do DNA e da genômica. Através de vários meios de comunicação, quase que diariamente, são veiculadas informações sobre DNA, clones, organismos transgênicos, terapia gênica etc. O conhecimento gerado pelo estudo de genomas completos ou de trechos destes e também do seu funcionamento tem permitido grandes avanços para a melhoria da vida humana, daí o grande interesse da mídia em abordar constantemente estas questões.

Interesse mediático à parte, é necessário um enfoque mais acadêmico e um tratamento mais científico para tais assuntos, principalmente nos cursos de Biologia e em outras áreas científicas, relacionadas diretamente com os estudos sobre a vida, sua diversidade, evolução e a conservação das espécies. Estudos desta natureza podem se valer das diferenças encontradas na sequência de

bases do DNA, indicando o grau de similaridade entre espécies ou entre populações de uma mesma espécie.

Assim, o propósito maior apresentado neste experimento – Classificando Abelhas – é simular o emprego de um marcador molecular em estudos biológicos e discutir seu potencial em inferências sobre a biodiversidade, classificação e conservação de espécies.

A atividade proposta amplia a visão sobre o DNA e sobre as informações nele contidas, sua importância em assuntos extremamente complexos para a tomada de decisões como as relativas a política conservacionista e de proteção de nossa diversidade biológica.

Um estudo de caso – múltiplas funções

A relevância pedagógica desta atividade é por permitir que o aluno assuma o papel de um pesquisador, teste uma hipótese científica, tire conclusões a respeito dos organismos estudados e compreenda o tipo de inferências possíveis de serem feitas com os resultados obtidos. De uma forma lúdica o aluno tem a possibilidade de perceber que, em ciência, trabalha-se com hipóteses temporárias, passíveis de modificações a cada novo fato que se descobre.

Como este experimento é um estudo de caso, recomenda-se que, na fase inicial, seja estudada a atividade – Classificando a Diversidade – descrita e desenvolvida por Mori *et al* (2010), uma vez que, com certeza, a realização e o entendimento de – Classificando Abelhas – será mais eficiente após o estudo de Classificando a Diversidade.

Para a realização pedagógica desta experiência sobre diversidade são necessários os seguintes materiais (Figura 1):

- Oito abelhas de pelúcia, quatro identificadas como

SP e quatro, como PR

- Dentro de cada abelha, uma estrutura plástica
- Dentro de cada estrutura plástica, quatro círculos de barbante com marcas coloridas
- Um círculo de barbante com marcas de quatro cores diferentes
- Tesouras coloridas (4 cores diferentes)



Figura 1. Foto ilustrativa dos materiais utilizados na atividade.

O problema biológico

Em abelhas, e em geral em quase todos os organismos, as características morfológicas são empregadas para a classificação e identificação das espécies. Esta atividade é um estudo de caso, inspirado em um projeto de mestrado, em que se estudou abelhas da espécie *Plebeia remota*, uma abelha nativa sem ferrão. Os indivíduos foram coletados de ninhos localizados em dois pontos diferentes: Cunha (SP) e Prudentópolis (PR) (Figura 2), constituindo assim duas populações distintas. Diferenças morfológicas entre os indivíduos dessas duas populações são praticamente inexistentes. No entanto, apresentam características comportamentais diferentes, como a arquitetura do ninho (Figura 2) e o cheiro do cerume. Essas evidências levaram os pesquisadores a procurarem novas “ferramentas” metodológicas que fossem eficientes para resolver a hipótese de que se tratava-se de duas espécies ou de uma só.

O modo de aplicação

Antes de aplicar a atividade para um grupo de estudantes o professor (a) deverá ler cuidadosamente o conteúdo deste manual e proceder de acordo com uma das sugestões a seguir:

- introduzir o problema biológico para a classe, apresentando o caso das duas populações de abelhas morfológicamente indistinguíveis, porém com características comportamentais diferentes. Deixar claro que as abelhas das duas populações foram classificadas como sendo da mesma espécie, com base em características morfológicas;
- apresentar as hipóteses a serem testadas, através de algumas questões: - “Os organismos dessas duas populações são realmente iguais? Pertencem à mesma espécie? Marcas ocultas, análise do DNA, podem nos revelar algo a mais sobre essas abelhas? Será que geneticamente também são idênticas, como mostra a morfologia?;
- caso os alunos já tenham noções básicas sobre o DNA mitocondrial, enzimas de restrição, eletroforese e marcadores moleculares, a atividade poderá transcorrer como indicado no item “Procedimento para o aluno”. Após a simulação da digestão e da eletroforese do DNA mitocondrial, os alunos poderão discutir em grupo as questões dos itens “Entendendo a Atividade” e “Relacionando Conceitos”;
- caso os alunos ainda não tenham essas noções básicas, a atividade poderá ser usada para sensibilizar os alunos para o estudo de métodos de análise molecular de organismos. Conceitos sobre o DNA mitocondrial, enzimas de restrição, eletroforese etc, poderão ser introduzidos no decorrer da atividade. Para esse fim, o professor poderá utilizar as perguntas do item “Entendendo a Atividade” à medida que a atividade for sendo desenvolvida. Se o professor (a) optar por esse modo de aplicação, no item “Aplicando a atividade em sala de aula”, encontrará o número das questões do “Entendendo a atividade” que podem ser utilizadas nos diferentes momentos;
- o professor (a) poderá copiar a figura que esquematiza o gel de eletroforese (Figura 4) e distribuí-la aos diferentes grupos de alunos para que eles possam preencher os resultados da simulação da eletroforese. O professor (a) poderá finalizar a atividade com a representação dessa figura na lousa indicando, na primeira coluna, os fragmentos do marcador de peso molecular e pedindo aos alunos que preencham as demais colunas;
- a quinta molécula de DNA mitocondrial de cada abelha (SP e PR), deverá ser distribuída para os grupos de alunos somente no final da atividade, após a discussão dos resultados da eletroforese, pois envolve um conceito novo, o de mapa de restrição.

Aplicação da atividade em sala de aula

a) Procedimentos do mediador

1. Dividir os alunos em 4 turmas de dez. Se a classe for menor do que 40 alunos, aconselha-se a manutenção do número de grupos, mesmo que menores.
2. Explicar o problema biológico a ser estudado (ver - “Preparando a Atividade” e Anexo).
3. Distribuir duas abelhas, uma SP e a outra PR, por turma, e pedir aos alunos para compararem a morfologia externa das abelhas.
4. Estabelecer a hipótese: Os organismos dessas duas populações são realmente iguais?
5. Fazer perguntas como as que se seguem:
 - As abelhas podem possuir diferenças (características) ocultas?
 - Onde estariam localizadas essas possíveis diferenças?
 - O DNA é um bom candidato para essas comparações?
6. Pedir para os alunos simularem a extração da mitocôndria e do DNA, abrindo a abelha (cada abelha possui uma abertura, na parte “ventral”, fechada com velcro) e retirando de dentro a estrutura plástica. (pergunta 1 do item - Entendendo a atividade).
7. Pedir aos alunos para abrirem a estrutura de plástico (mitocôndria) e retirarem os barbantes (as moléculas de DNA). Cada mitocôndria possui mais de uma molécula circular. Explicar que todas são idênticas em termos de sequência de DNA e que esse genoma é circular na grande maioria dos organismos. As marcas coloridas nos círculos simbolizam sequências de 6 pares de base. Cada cor representa uma sequência diferente que é reconhecida por enzimas que cortam nesses pontos. (Ver Figura 3 para DNA mitocondrial e Enzimas de Restrição e perguntas 2 e 3 do Entendendo a atividade). Pedir para os alunos cortarem, em um dos círculos do barbante, nas marcas coloridas, usando as tesouras com as cores correspondentes.
8. Solicitar que eles procedam da mesma maneira com os demais círculos de barbante. Atenção para que não haja mistura dos fragmentos originados pelos cortes. (perguntas 4 e 5 do Entendendo a atividade).
9. Pedir para medirem os fragmentos com uma régua e usarem a seguinte escala de conversão: 1cm = 500 pares de bases.
10. Pedir para simularem a separação desses fragmentos numa eletroforese. Podem usar a mesa para re-

presentar o gel. Explicar que em cada coluna serão separados os fragmentos originados pelo corte de apenas uma enzima de restrição. Explicar que DNAs das diferentes abelhas serão analisados separadamente. Dê a dica de que o DNA não migra esticado, mas sim compactado. Cada aluno situa os seus fragmentos em uma coluna, obedecendo aos princípios da eletroforese (migração por carga e tamanho, fragmentos maiores migram mais lentamente que os menores). (Ver Figura 3 e perguntas 6 e 7 do Entendendo a atividade).

11. Distribuir a figura 4, previamente copiada, que contém o esquema do gel e pedir para preencherem com os resultados da eletroforese.
12. Desenhar na lousa um retângulo simbolizando o gel, com nove poços. Desenhar, na coluna correspondente ao primeiro poço, o padrão de bandas de um marcador molecular (veja a figura no anexo). Pedir para um aluno ir até a lousa e posicionar os fragmentos obtidos com a enzima verde da abelha de SP no poço 2, outro aluno para representar os fragmentos obtidos com a mesma enzima, porém da abelha do PR. Prossiga até completar os oito resultados, sempre colocando, lado a lado, os resultados para SP e PR, pois desse modo os alunos rapidamente visualizarão as diferenças. Siga a ordem enzima verde, azul, vermelha e laranja.
13. Discutir os resultados. (perguntas 8 e 9 do Entendendo a atividade).
14. Distribuir para cada grupo a quinta molécula de DNA, na qual todos os pontos de corte para as quatro enzimas estão representados. Explicar que, embora eles tenham analisado separadamente as moléculas (cada poço para uma enzima de restrição), os sítios de corte para todas as enzimas estão presentes em todas as moléculas e numa disposição definida. Essa representação chama-se mapa de restrição, pois apresenta a posição de todos os sítios de corte das diferentes enzimas em uma única molécula. A elaboração de um mapa de restrição não é o objetivo dessa atividade e, caso o professor (a) queira saber mais a esse respeito, deverá ler o item correspondente no anexo.

b) Procedimento para os alunos

1. Analisar e comparar as características morfológicas das duas abelhas. Verificar as procedências (SP=São Paulo ou PR=Paraná) marcadas na etiqueta.
2. Metade do grupo deverá:

- ficar responsável por uma abelha e, a outra metade, pela outra;
 - retirar de dentro das abelhas a estrutura de plástico e os círculos que lá se encontram;
 - notar que cada círculo possui marcas com cores diferentes.
3. Utilizar uma tesoura para cortar nos pontos determinados;
 - manter separados os pedaços resultantes do corte de cada círculo. (Atenção: tesoura azul corta nas marcas azuis, a verde, nas marcas verdes e assim por diante);
 - medir os pedaços resultantes dos cortes com uma régua;
 - utilizar a escala de conversão 1cm = 500 pares de base;
 - anotar os tamanhos em uma folha de papel.
4. Simular a separação dos pedaços gerados pelo corte das diferentes tesouras. (Esse processo é denominado eletroforese);
 - usar a mesa como o substrato para a separação. (Lembrar que a separação de DNA em uma eletroforese obedece a dois princípios: carga e tamanho)
 - separar em uma mesma coluna os fragmentos resultantes do corte com a tesoura de uma determinada cor para a abelha SP, e na coluna ao lado, os da abelha PR;
 - checar com o professor (a) se o procedimento do grupo está correto quanto à separação dos fragmentos.
5. Preencher a figura 4 com o esquema da eletroforese realizada;
 - desenhar na figura a posição dos diferentes fragmentos obtidos;
 - levar em consideração: (a) o tamanho de cada fragmento e (b) a posição que um fragmento de igual tamanho possui após o procedimento de separação por eletroforese.
6. Discutir os resultados com os colegas do grupo.

Entendendo a atividade

Discutir com os colegas e responder as questões de 1 a 9.

1. O que representa a estrutura plástica que se encontra dentro de cada abelha?

2. O que representam os círculos de barbante?
3. O que representam as marcas coloridas nos barbantes?
4. O que representam as tesouras?
5. O que são enzimas de restrição?
6. Como se separam e se visualizam as moléculas de DNA em um laboratório de pesquisa?
7. Quais são os princípios da eletroforese?
8. Como se interpreta o padrão de fragmentos obtido para cada enzima e para cada abelha? O que cada padrão quer dizer em termos de sequência de DNA?
9. Como podem ser interpretadas as diferenças observadas nos padrões de fragmentos em termos biológicos e evolutivos?

Relacionando conceitos

1. Em uma célula, onde podem ser encontradas moléculas de DNA?
2. Quais são as características bioquímicas do DNA?
3. Como se pode extrair o DNA de uma célula?
4. Qual a relação de tamanho entre o DNA mitocondrial e o nuclear?
5. Quais as características apresentadas pelo DNA mitocondrial que o tornam um tipo de marcador molecular muito eficiente?
6. Por que em cada estrutura plástica existe mais de um barbante? O que eles representam? Por que estão em círculos?
7. Você considera que as abelhas originárias dessas duas regiões geográficas são iguais? Como você procederia se fosse consultado para assessorar um projeto de conservação das espécies em questão? Qual das duas populações você indicaria para o projeto?
8. Qual a importância de marcadores “ocultos” (no caso, obtidos diretamente da análise de DNA) para trabalhos desse tipo?

ANEXOS

1. INFORMAÇÕES PARA O PROFESSOR

O Material Biológico

O Brasil, país extremamente rico em sua fauna, é o local onde há uma grande diversidade de abelhas. As abelhas sem ferrão, os meliponíneos, possuem um

importante papel ecológico (polinização) e econômico (produção de mel). São exemplos dessas abelhas a jataí, irapuá, guaraipe, uruçú, mandaçaia etc. Há mais de 300 espécies na América do Sul.

O Problema Biológico

O forte desmatamento vem colocando em risco a sobrevivência de muitas espécies e, no caso das abelhas, estão mais diretamente ameaçadas aquelas que constroem seus ninhos em árvores como a abelha *Plebeia remota*, um meliponíneo de aproximadamente 7 mm. A distribuição geográfica desta espécie abrange os estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo.

Ninhos coletados em duas localidades diferentes (Estado de São Paulo e Paraná) estavam sendo mantidos em um meliponário (nome dado ao local de criação de meliponíneos) para estudos comportamentais e ecológicos. Os pesquisadores notaram que as abelhas apresentavam diferenças no comportamento (tempo de “diapausa” durante o período de clima frio) e na arquitetura do ninho, sendo que em uma das localidades, os favos de cria eram cobertos por um invólucro de cera, enquanto na outra, o invólucro era ausente (figura ao lado). O cheiro interno dos ninhos também chamava a atenção pela diferença. No entanto, os especialistas em classificação, os taxonomistas, consideram essas abelhas como pertencentes à mesma espécie, pois diferenças nas características morfológicas são praticamente inexistentes.

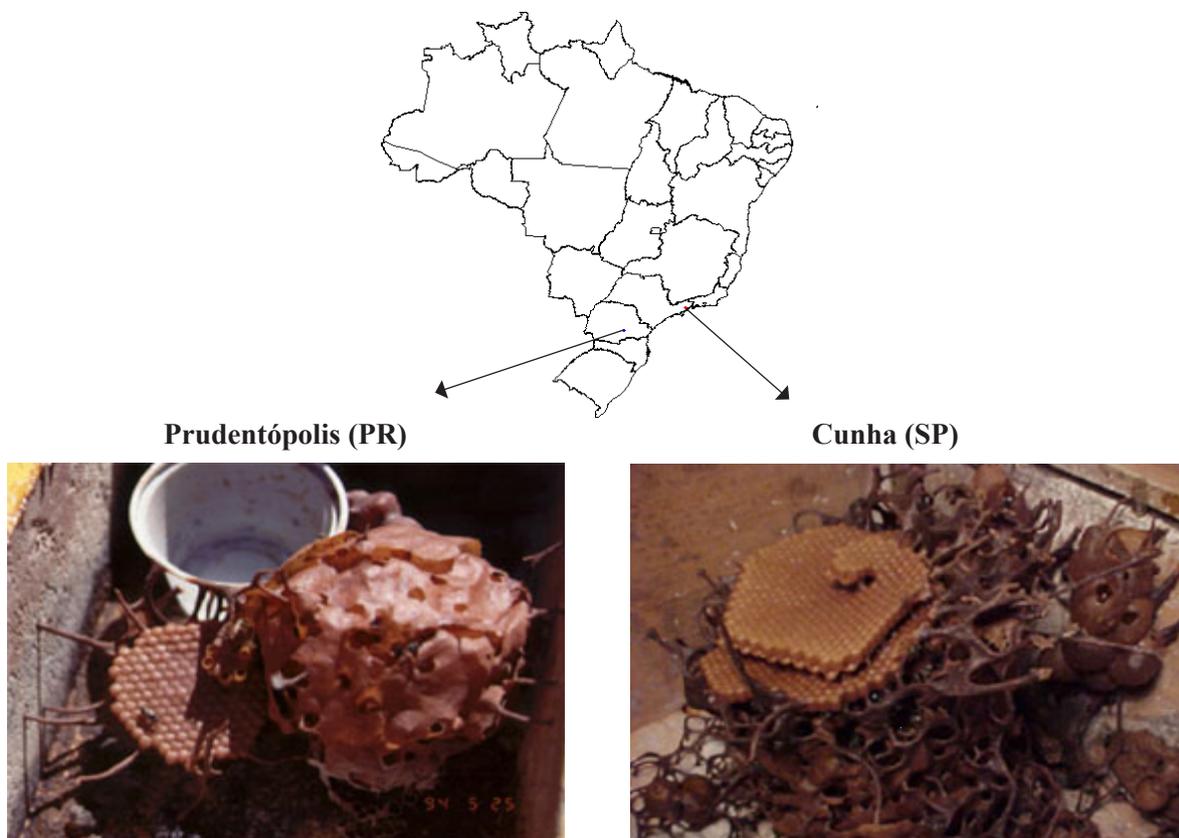


Figura 2. Local de coleta das abelhas: São Paulo e Paraná, e aspectos internos de seus ninhos, respectivamente. (fotos: laboratório de abelhas - Depto de Ecologia-IB-USP).

Numa tentativa de verificar se existiam diferenças entre as abelhas dessas duas populações, o DNA mitocondrial foi estudado com enzimas de restrição.

Obtenção de DNA

Para a extração de DNA de qualquer organismo é necessário, inicialmente, que se rompam os tecidos, cé-

lulas e organelas. Essa quebra pode ser mecânica ou por reagentes, como detergente e enzimas. O DNA é purificado dos demais componentes da célula por centrifugação e, em seguida é precipitado por adição de sal e álcool. Esses procedimentos constituem os princípios básicos de extração de ácidos nucleicos embora inúmeros protocolos, levemente diferentes, possam ser utilizados.

O DNA mitocondrial

As mitocôndrias possuem um genoma próprio. O DNA mitocondrial é circular e compacto, ou seja, quase não há DNA espaçador entre os diversos genes nele presentes e os genes não possuem íntrons. Assim sendo, praticamente toda a sequência de bases desse genoma codifica um produto. O tamanho do genoma nos animais é de aproximadamente 16.000 pares de bases. Uma mitocôndria possui mais de uma molécula idêntica de DNA, portanto sua representação em relação às cópias de regiões nucleares é maior, podendo ser da ordem de 10 vezes.

Enzimas de Restrição

As enzimas de restrição foram descobertas na década de 60 e, a partir dessa data, centenas delas têm sido purificadas e disponibilizadas para análise de DNA. Essas enzimas reconhecem sequências específicas de base em uma molécula de DNA e cortam nesses pontos. Desse modo, vários fragmentos são gerados. Há enzimas que reconhecem 6 bases (por exemplo GAATTC) como seu ponto de corte, enquanto outras reconhecem sequências de quatro, oito ou doze pares de bases. Elas são extremamente utilizadas na análise do material genético, pois cortam a molécula de DNA em locais específicos. Desse modo, mesmo sem saber a exata sequência de bases de um genoma, é possível inferir semelhanças ou diferenças nas sequências correspondentes aos sítios de restrição.

Eletroforese

Os fragmentos de DNA gerados após o tratamento com enzimas de restrição são separados por meio da técnica denominada eletroforese. Através dessa técnica, moléculas eletricamente carregadas migram, quando submetidas a um campo elétrico, com velocidades que dependem do tamanho de cada uma delas. A amostra a ser separada, no caso, o DNA, é aplicado em um substrato poroso. Normalmente, o mais utilizado é a agarose, preparado na forma de um gel com uma solução tampão.

Assim, numa sequência de eventos, pode-se acompanhar e verificar as etapas do experimento: a) Após a aplicação das amostras de DNA em poços desse gel, ele é submetido a uma corrente elétrica, gerando uma diferença de potencial; b) O DNA, por ser uma molécula carregada negativamente (devido aos grupos fosfatos), migra para o polo positivo da cuba; c) Tal migração segue também outro princípio, o de que fragmentos menores migram mais rapidamente do que os maiores; d) Após a separação resta ainda visualizar o DNA e para isso utilizam-se corantes específicos, como o brometo de

etídeo. O brometo de etídeo intercala entre as bases dos ácidos nucleicos, e quando o gel é colocado sobre luz ultravioleta, ele fica fluorescente, indicando, dessa forma, onde, no gel, estão os fragmentos de DNA que foram separados; e) Quando se usa essa técnica, sempre se corre também no gel, em um poço isolado, um DNA marcador, cortado em diversos fragmentos que possuem tamanho conhecido. Desse modo, é possível estimar o tamanho, em pares de base, de fragmentos desconhecidos, usando tal marcador como base para o cálculo (Figura 3).

Aplicação do DNA mitocondrial como ferramenta molecular

O DNA mitocondrial tem sido muito empregado em estudos que visam verificar a variabilidade genética dentro da espécie ou entre espécies. As diferenças no padrão de fragmentos, gerados pela mesma enzima de restrição entre indivíduos diferentes (podem ser de origens geográficas diferentes), são devidas a:

1. mutação no sítio de corte, uma simples substituição, ausência ou adição de uma base, na sequência onde a enzima corta é suficiente para o não reconhecimento dessa região pela enzima;
2. adições ou ausências de trechos de DNA entre os sítios de corte, resultando em fragmentos de tamanhos diferentes;

Desse modo, a substituição de bases ou pequenos eventos de adição ou deleção, podem criar ou eliminar sítios de corte para uma enzima em particular, alterando o número de fragmentos gerados ou seus tamanhos.

Resultados obtidos

Alíquotas de DNA extraídas de abelhas provenientes de São Paulo e do Paraná foram tratadas separadamente com 4 enzimas de restrição, simbolizadas por cores diferentes. Após medir (em centímetros) os fragmentos originados pelo corte com as enzimas e converter as medidas para pares de bases, os resultados podem ser apresentados como na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Os tamanhos dos fragmentos gerados após o tratamento com cada enzima são apresentados para cada abelha. O tamanho é dado em pares de bases.

Abelha Origem	Enzima Verde	Enzima Azul	Enzima Vermelha	Enzima Laranja
SP	18.000	18.000	18.000	16.000 2.000
PR	12.500 5.500	13.500 4.500	8.500 6.000 3.500	16.000 2.000

Após o cálculo do tamanho dos fragmentos gerados pelas diferentes digestões, foi simulada uma eletroforese que pode ser representada graficamente como na figura abaixo (Figura 3).

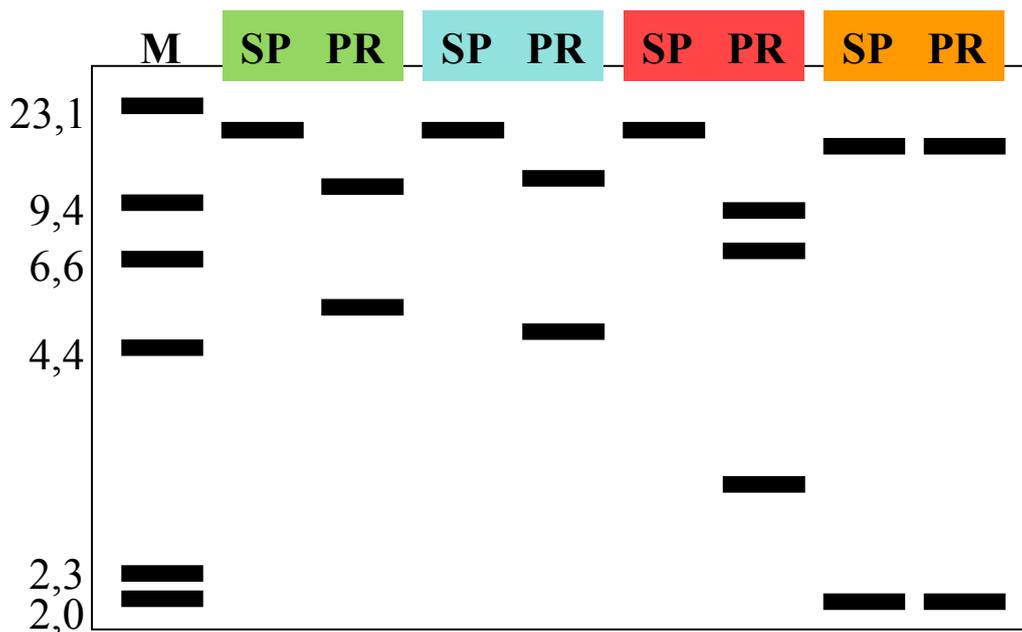


Figura 3. Eletroforese dos DNA mitocondriais extraídos de abelhas de diferentes regiões geográficas e que foram submetidas à digestão por enzimas de restrição. Facilmente se observa que o padrão de fragmentos entre as amostras de abelhas de SP e PR é diferente para as 3 primeiras enzimas e, somente idêntico, para a última (laranja). M- marcador de peso molecular; tamanho dos fragmentos em kilobases.

A apresentação deste resultado é apenas uma parcela de um projeto de pesquisa real e representa uma pequena mostra do tipo de informação que se pode obter com marcadores originados da análise direta do DNA. A partir dos resultados obtidos, podemos fazer algumas considerações:

1. As abelhas de SP e PR são geneticamente diferentes.
2. Essas duas populações parecem estar isoladas e seus respectivos patrimônios genéticos são diferentes. A diferença é um forte indício de que podem ser duas espécies distintas.
3. Em termos de conservação da espécie, as duas áreas deveriam ser preservadas visto que, mesmo considerando essas abelhas como pertencentes à mesma espécie, elas representam patrimônios genéticos distintos, característica importante para a manutenção da variabilidade genética intrínseca da espécie.
4. Os marcadores moleculares podem fornecer novos dados sobre a diversidade entre espécies ou variabilidade genética de uma mesma espécie, podendo mostrar isolamento entre populações muitas vezes não caracterizado por barreiras físicas, como um rio, uma montanha etc.

5. Os marcadores moleculares empregados nesses estudos são, em sua maioria, considerados neutros, ou seja, não estão sob o efeito de seleção. Ao contrário, as características morfológicas parecem sofrer forte efeito da seleção natural e, além disso, são muitas vezes determinadas por vários genes (herança poligênica).

Referências Bibliográficas

- Arias M.C. & Infante-Malachias ME. (2001). RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. "In" *Biologia Molecular e Evolução* (Ed. S.R. Mاتيoli), pp 143-152, Holos Editora, Ribeirão Preto.
- Francisco, F.O. (2002). *Diversidade genética de populações de abelha sem ferrão Plebeia remota: Análise do DNA mitocondrial e microssatélites*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Mori L., Miyaki C.Y., Arias M.C. & Dessen E. (2010). Classificando a Diversidade Biológica. *Genética na Escola*, 05.01, 13-24.

1. ESQUEMA DO GEL A SER DISTRIBUÍDO PARA OS ALUNOS

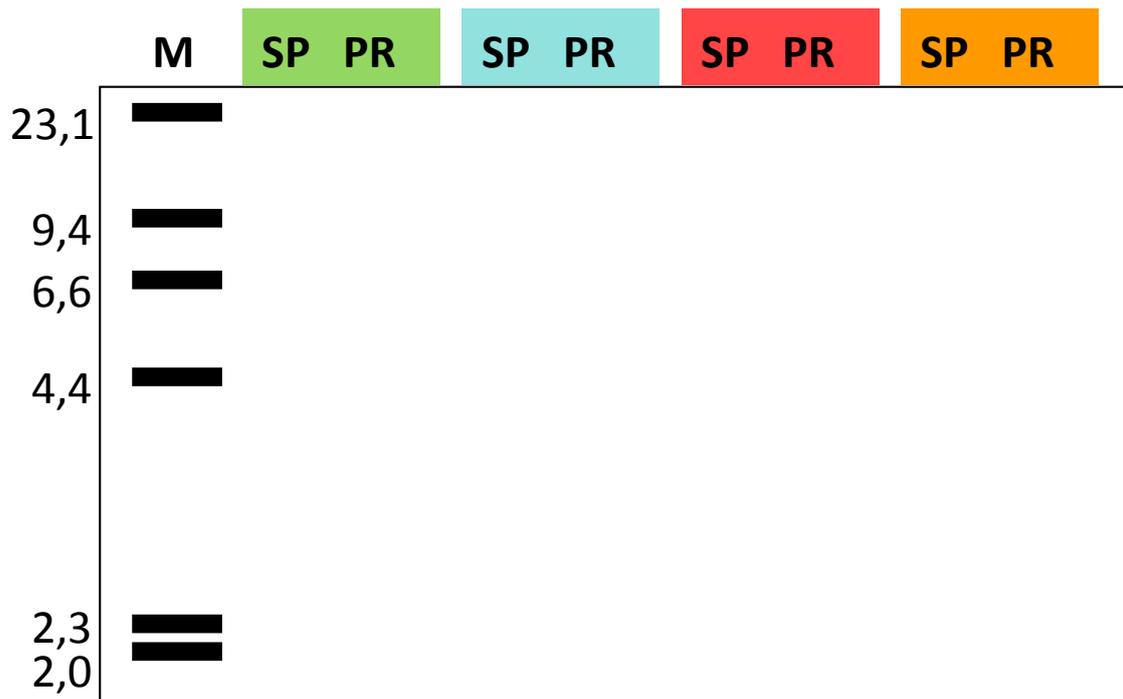


Figura 4. Esquema do gel de eletroforese

Agradecimentos

Aos inúmeros professores, alunos e colegas que executaram a atividade nas “Oficinas Livres” no VIII Encontro e Perspectivas do Ensino de Biologia, em 2002, e no evento “Genética na Praça”, durante o 47º Congresso Brasileiro de Genética, promovido pela Sociedade Brasileira de Genética, em 2001, e que fizeram várias sugestões para aperfeiçoar a atividade. À Profa. Dra. Eliana M. B. Dessen pela leitura criteriosa e sugestões. Esse

trabalho contou com apoio financeiro da Pró-Reitoria de Graduação da Universidade de São Paulo – Projeto Pro-Mat (2003-2005). Os conjuntos de materiais para a aplicação da atividade em uma classe de 40 alunos estão à disposição, para empréstimo, na Estação Ciência (<http://www.eciencia.usp.br>) – Experimentoteca. Rua Guaicurus, 1394, Lapa, São Paulo. Telefone:(11)3673-7022.