

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

Flávio José de Assis Barony

**DESAFIOS E POSSIBILIDADES PARA O CUMPRIMENTO DO
EMENTÁRIO DA DISCIPLINA DE LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL EM UMA ESCOLA TÉCNICA
FEDERAL**

Belo Horizonte - MG, Brasil

Dezembro de 2018

Flávio José de Assis Barony

**DESAFIOS E POSSIBILIDADES PARA O CUMPRIMENTO DO
EMENTÁRIO DA DISCIPLINA DE LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL EM UMA ESCOLA TÉCNICA
FEDERAL**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do Grau de Especialista de Microbiologia Aplicada.

Orientador:

Marco Aurélio Soares

Belo Horizonte - MG, Brasil

Dezembro de 2018

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus, em primeiro lugar e sempre! Pois ter a oportunidade de cursar uma pós-graduação em uma das 500 melhores Universidades do mundo e entre as 20 melhores da América Latina é um privilégio!

Agradeço o apoio da minha esposa e filhos pelo entendimento que tiveram na minha ausência para cursar esta pós-graduação, bem como de todos os familiares e amigos devido à ausência em vários momentos.

Agradeço aos nobres professores da minha trajetória acadêmica, pois certamente o aprendizado com cada um deles me possibilitou chegar até aqui...

Agradeço ao CEFET *campus* Timóteo pela oportunidade de desenvolver este TCC no meu ambiente de trabalho e ao IFMG/GV por permitir a realização desta atividade em paralelo a outras demandas de rotina.

Agradeço aos professores desta significativa Especialização *Lato sensu*, em especial, o meu orientador e prof. Marco Aurélio Soares.

EPÍGRAFE

“É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal forma que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática”.

Parte-se do princípio que “ensinar exige a corporeificação das palavras pelo exemplo”.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino”.

Paulo Freire (1921 – 1997)

RESUMO

Do ponto de vista histórico, as instituições Educacionais Brasileiras são mais recentes do que quando comparadas a países de primeiro mundo. Ainda assim, não há dúvidas sobre as ilhas de excelência em ensino, pesquisa e extensão dispostos nos mais diversos pontos do território Brasileiro. Todavia, a difusão da informação pela educação enfrenta diversas barreiras também históricas: qualidade física dos prédios escolares, falta de incentivo à qualificação, baixos salários dos profissionais, estudantes com defasagem de aprendizado e até mesmo constantes mudanças na legislação educacional. Entre as dificuldades a serem superadas consta o ensino da Microbiologia nos mais diversos níveis de ensino. O presente trabalho tem por objetivo geral elencar os desafios e possibilidades para o cumprimento do Ementário da disciplina de Laboratório de Microbiologia Industrial, do 1ºAno do Curso Técnico em Química – Integrado (Ensino Médio), em uma instituição de ensino público Federal. A metodologia utilizada foi revisão bibliográfica sobre os dados da educação brasileira e com enfoque no Ensino da Microbiologia. Como resultado foi elaborado o “Roteiro de Aulas Práticas” estritamente conforme o ementário, com o detalhamento de 30 atividades exequíveis e condizentes à estrutura existente e/ou possível de ser adquirida ao longo do ano letivo de 2018. Além disso, o valor aproximado para implementação de um laboratório de nível médio técnico profissionalizante é de R\$153.980,90, com 79 itens elencados entre os equipamentos, vidrarias e reagentes, ou seja, sem mensurar a edificação. Foi considerado que os reagentes terão durabilidade de aproximadamente 3 anos letivos para as atividades de ensino. Por fim, infere-se que houve considerável aprendizado a partir das adaptações e/ou materiais alternativos propostos no “Roteiro de Aula Prática”, mas há limitações por se tratar de ensino técnico profissionalizante, haja vista que no mercado de trabalho o estudante egresso vivenciará produtos e processos normalmente normatizados e especificados para as mais diversas atividades microbiológicas e biotecnológicas.

Palavras-chave: aula prática, educação profissional, formação continuada, microbiologia, técnico em química.

ABSTRACT

From a historic point of view, the Brazilian Educational Institutions are more recente if they are compared to first world countries's. But there are no doubts about "istands" of excellence concerned to learning, search and extensions which are presented in a variety of different places in Brazilian territory. However information spreading by means of education faces several historic barriers: the building physical qualities, lach of incentive to quality, profesional's low salaries, students who demonstrate gaps on learning and even constant changes on educational legislation. Among the difficulties to be overcome there is also Microbiology Teaching in the most varied levels of learning. The present paper presents as its general objetctive listing the challanges and possibilities aimed at fulfilling the "Industrial Microbiology Laboratory" ementary, in the First Year of Chemistry Technician Course – Integrated – at a Federal Public Institution the bibliographic revision of the Brazilian education data highing Microbiology Teaching has been the adapted methodology here. As a result a Guide for Practical Classes has been elaborated and has algo been strictl, based on the ementary. This Guide offers the detailing of 30 achievable and consistent to the existing and/or possible to be acquired along 2018 activities. Besides that, the average amount to implement a "Technical Vocational mid-level Laboratory" is around R\$153.980,90, which accounts for 79 items such as equipments, glassware and reagents. It means that edification has not been mensured. It has been considered that the reagents will last for around 3 school Years for the teaching activities. Finally it ean be said there was considerable learning from the adapted and/or proposed alternative materials in the "Guide for Practical Activities", however there were limitations due to the fact that it was thi "Vocational Technical Teaching" under studying. It must be taken into consideration for instance, that student egress will get in touch with normalized and specified products and processes for the most variety kinds of Microbiological and Biotechnology activities in the workmarket.

Key words: practical class, professional education, continuing education, microbiology, Chemistry Technician.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anvisa Agência de Vigilância Sanitária

Funarbe Fundação Arthur Bernardes

CEFET Centro Federal de Formação Tecnológica

IFs Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia

IFMG Instituto Federal de Minas Gerais

INEP Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira

MEC Ministério da Educação

μL Microlitro

PPC Projeto Pedagógico de Curso

TCC Trabalho de Conclusão de Curso

UFV Universidade Federal de Viçosa

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 A Educação Brasileira	12
2.2 O quantitativo de estudantes do Ensino Médio no Brasil.....	13
2.3 O PPC e o ementário	14
2.4 O Ensino Profissionalizante no Brasil e a convergência do curso técnico de química com a microbiologia	15
2.5 O Ensino da Microbiologia nos diferentes níveis de Ensino	18
2.6 Práticas alternativas para Microbiologia	20
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Diagnóstico da estrutura do Laboratório de Microbiologia.....	25
5.2 Roteiros de aula prática conforme ementário.....	26
5.3 Custos para instalação do Laboratório de Microbiologia Industrial	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8 ANEXOS.....	46
ANEXO 1 – CONTEÚDO DO EMENTÁRIO DA DISCIPLINA MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL (AULA TEÓRICA)	46
ANEXO 2 – CONTEÚDO DO EMENTÁRIO DA DISCIPLINA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL (AULA PRÁTICA)	47
9 APÊNDICES	48
APÊNDICE 1 – LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS DISPONIBILIZADOS OU NÃO NO LABORATÓRIO, ALÉM DOS CUSTOS CONFORME COTAÇÃO (DEZEMBRO/2018).....	48

APÊNDICE 2 – ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA CONFORME CONTEÚDO DO EMENTÁRIO (VERSÃO DO PROFESSOR)	51
UNIDADE 1: SEGURANÇA NO LABORATÓRIO	57
1.1 - REGRAS BÁSICAS	57
1.2 - PRINCIPAIS VIDRARIAS E EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	60
1.3 – MODELO DE RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA	66
UNIDADE 2: MICROSCÓPIA ÓTICA	69
2.1 - MICROSCOPIA	69
2.2 - AULAS EXTRAS DESTA UNIDADE	74
2.2.1 - Microscópio com o seu celular	75
2.2.2 - Aplicativos para aulas de Microbiologia	75
2.2.3 - Coleta de amostras.....	76
2.2.4 - Preparação de lâminas	77
UNIDADE 3: EXPERIMENTO COM CÉLULAS	79
3.1 – OSMOSE	79
3.2 - EXTRAÇÃO DO DNA VEGETAL	87
3.3 – AULA EXTRA: VISUALIZAÇÃO DE FUNGOS DISCUTIDOS EM AULA TEÓRICA	93
UNIDADE 4: TÉCNICAS DE ESTERELIZAÇÃO	94
4.1 - TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO	94
UNIDADE 5: PREPARO DE MEIO DE CULTURA.....	102
5.1 - MEIOS DE CULTURA	102
5.2 – AULA INTEGRADA: ESTERILIZAÇÃO, MEIO DE CULTURA E CÉLULAS	104
5.3 – DILUIÇÃO SERIADA	109
5.4 - MEIOS DE CULTURA	110
UNIDADE 6: OBSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	113
6.1 - OBSERVAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS	113
6.2 - PLAQUEAMENTO BACTERIANO E AVERIGUAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS.....	115
6.3 - IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E COLORAÇÃO GRAM.....	117

6.4 - IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	119
6.5 – REVISÃO GERAL A PARTIR DE NOVAS AULAS	120
6.5.1 – Antibiograma.....	121
6.5.2 – Bioprospecção de fungos.....	123
6.5.3 – Teste de Rugai para identificação presuntiva de Enterobactérias	127
UNIDADE 7: EXPERIMENTOS COM ENZIMOLOGIA.....	132
7.1 – ESTUDO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ENZIMAS PRESENTES EM FRUTOS.....	132
7.2 – UM ESTUDO SOBRE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA.....	138
7.3 – CATALISANDO A HIDRÓLISE DA UREIA EM URINA.....	141
UNIDADE 8: PREPARO E ANÁLISE DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS.....	147
8.1 – PREPARO DE IOGURTE	147
8.2 – PREPARO DE DERIVADOS LÁCTEOS	151
8.3 – INVESTIGANDO COMPONENTES PRESENTES NO LEITE	158
8.4 – TESTES DE QUALIDADE DO LEITE.....	164
8.5 – ANÁLISE QUALITATIVA DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS COM ÍON CÚPRICO.....	169
UNIDADE 9: FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	173
9.1 – A QUÍMICA DA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS	173
9.1.1 – Produção de vinho.....	173
9.1.2 – Experimento básico e visual sobre fermentação	178
9.2 – AULAS EXTRAS: A QUÍMICA E A FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E NÃO ALCOÓLICAS.....	179
9.2.1 – Cultivo de Leveduras para produção de cerveja	179
9.2.2 – Bebidas fermentadoras e ação probiótica	182
APÊNCIDE I – MODELO DE RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA	185
APÊNDICE 3 – ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA CONFORME CONTEÚDO DO EMENTÁRIO (VERSÃO DO ESTUDANTE)	186
APÊNDICE 4 – NOVO LAYOUT DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL.....	187

1 INTRODUÇÃO

“O que os olhos não veem o coração não sente” é um ditado popular que pode ser aludido ao ensino da Microbiologia e que ainda soa antagônico se contextualizado com um dos maiores educadores do mundo, Paulo Freire, que defendia a máxima de “educar com o coração”. Assim, educar com o coração se é impossível visualizar “a olho nu” o mundo microbiano e acrescido das inúmeras limitações nas mais diversas instituições de ensino do país, as quais estão sob as mais diferentes realidades estruturais, torna-se um desafio a ser superado.

No âmbito geral, os dados sobre o rendimento dos estudantes brasileiros não são satisfatórios em todos os níveis, em especial, no ensino médio, os quais são publicados pelos mais diversos órgãos nacionais e internacionais. Problemas estruturais como baixa qualidade das salas de aula (por vezes até a ausência de espaço físico com as mínimas condições climáticas e sanitárias), salários desestimulantes, estudantes desinteressados, problemas sociais e familiares assumidos pela escola, professores sem a formação adequada (quase 20% dos docentes brasileiros não tem Ensino Superior), e tantos outros configuram alguns os percalços educacionais do país.

Problemas estes isolados ou associados podem comprometer o itinerário formativo do estudante, pois nem sempre é possível cumprir o ementário estabelecido no PPC (Projeto Pedagógico de Curso). O ementário por vezes não é cumprido na sua integralidade pelos motivos já elencados, mas a depender das especificidades pode estar relacionado aos desafios do processo de ensino-aprendizagem de cada disciplina, como é o caso da Microbiologia.

No rol dos problemas relacionados ao ensino da Microbiologia nos mais diversos níveis de ensino, a ausência de aulas e/ou atividades práticas dos conteúdos previstos no ementário é um problema significativo, principalmente nas aulas de Ciências e Biologia, as quais normalmente abarcam este conteúdo específico de forma mais intensa.

No tocante às escolas Técnicas Federais, as quais se apresentam como vocação a formação técnica profissional, o quadro geral é mais satisfatório. A partir da análise da nota do Enem (Exame Nacional do Ensino Médio), os resultados se equiparam aos melhores países do mundo, mas ainda assim muitos percalços são

enfrentados, sobretudo, após a ampla expansão ocorrida a partir da década passada, onde os *campi* passarão de aproximadamente 140 para 644 em 2016.

Muitas vezes os cursos profissionalizantes não apresentam a devida estrutura, inclusive nos cursos que adotam o conteúdo de Microbiologia como um dos componentes da matriz curricular.

No Centro Federal de Formação Tecnológica (CEFET MG), *campus* Timóteo, a disciplina de “Microbiologia Industrial” e a disciplina de “Laboratório de Microbiologia Industrial” fazem parte da matriz curricular do Curso Técnico Integrado em Química como componente curricular do 1º Ano, após alteração no PPC (Projeto Pedagógico de Curso). Nos anos de 2017 e 2018 ainda foi ofertada para o 3º Ano. O ementário foi elaborado por profissionais devidamente capacitados e engloba um considerável espectro de atuação da Microbiologia, todavia, a estrutura laboratorial não contempla o desejado para o nível de qualificação profissional almejado, o que requer grandes desafios para cumprir o ementário, sendo necessário adotar materiais alternativos para aulas práticas e até mesmo empréstimo em outros *campi*. As visitas técnicas também contribuem para a formação dos estudantes, obrigatoriamente.

No CEFET – *campus* Timóteo, a instituição desenvolve atividades no município há 19 anos e passou a ter sede própria e ampliada a partir de 2012. O contingente de 600 estudantes está distribuído em 3 cursos de Ensino Técnico Integrado e Subsequente (Edificações, Sistemas de Informação, Química e Metalurgia), além de 2 cursos superiores (Sistemas de Informação e Engenharia Metalúrgica). Há ainda cursos na modalidade EaD (Meio Ambiente e Eletrônica).

O PPC do curso Técnico de Química Integrado apresenta duas disciplinas da área da microbiologia, ambas no 1º Ano e com até 40 estudantes matriculados. A disciplina “Microbiologia Industrial” apresenta carga horária de duas (02) aulas teóricas por semana e sem divisão da turma. O ementário desta disciplina consta no anexo 1. Já a disciplina “Laboratório de Microbiologia Industrial” tem carga horária de duas (02) aulas semanais e os estudantes são divididos em duas turmas (Turma 1 e Turma 2). O ementário consta no anexo 2.

Posto isto, o presente TCC (Trabalho de Conclusão de Curso) apresentará os desafios e soluções a serem adotadas para o cumprimento do ementário da Disciplina do “Laboratório de Microbiologia Industrial” em um *campus* de uma Escola Técnica Federal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Educação Brasileira

Há abundante literatura publicada quanto ao pífio rendimento da educação brasileira quando medida por organizações internacionais, como o Pisa (Programa Internacional de Avaliação de Estudantes), que é coordenado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Na classificação sobre “Desempenho dos Brasileiros em Ciências”, o Brasil ocupa a antepenúltima classificação quando comparado aos países membros da OCDE, com forte desigualdade entre as redes de ensino (PISA, 2015). A pontuação da Rede Municipal, Estadual, Particular e Federal foi, respectivamente, 329, 394, 487 e 517 pontos, sendo que as Redes Particular e Federal não se diferenciaram estatisticamente. Há forte diferença também entre os estudantes dos Estados da federação, conforme o mesmo documento.

Por outro lado, os índices oficiais apontam aumento do número de crianças matriculadas. Na faixa etária de 4 a 5 anos, o índice é de 90,5% crianças matriculadas, ante 61% em 2001. No ensino médio (faixa etária de 15 a 17 anos) o resultado é bem inferior quanto ao número de matrículas, com apenas 67% atualmente, com leve evolução em relação a 2012, onde havia 61%. Concluintes do Ensino Médio aos 19 anos passou de 51,7% em 2012 para 59,3% em 2017. Em números absolutos são quase 3 milhões em idade escolar e que não estão matriculados. Questões sociais de vulnerabilidade, como renda, acesso ao saneamento básico, violência e outros mais ainda impedem o país de atingir números superiores estabelecidos pelo PNE (Plano Nacional de Educação). Todos os dados estão disponíveis em órgãos governamentais ou da sociedade civil sobre o PNE, como o anuário da Educação (TODOS PELA EDUCAÇÃO, 2018; PNE, 2018).

Em relação ao analfabetismo, o Brasil saiu da faixa de 65% de analfabetos em 1900 para 13,6% em 2000; e mais recente, em 2012, alcançou 8,7% na faixa etária da população de 15-17 anos. À título de comparação do espaço ainda a ser alcançado, países como Noruega, Austrália, Áustria e Espanha apresentam taxa de 0,0%, conforme dados da Pnud (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento) e citado pelo Mapa do Analfabetismo do INEP (INEP, 2004; IBGE, 2018).

Todos os estudos apontam para o drástico resultado alcançado no Ensino Médio, e tais números são reforçados por diversos trabalhos os quais fazem críticas a este nível de Ensino.

Na ótica da legislação, a educação Brasileira está sob a égide da Lei n.º 9394/1996, conhecida por LDB (Lei de Diretrizes e Bases da Educação), a qual “estabelece as diretrizes e bases da educação nacional”, perfazendo os níveis de ensino em dois grandes grupos. O primeiro nível formado pela Educação Básica, compreendida pela educação infantil, ensino fundamental (I e II) e ensino médio; e o segundo nível, que é a educação superior e agrupa a graduação e pós-graduação (BRASIL, 1996).

A Lei passou por diversas mudanças ao longo dos anos, culminando mais recentemente pela Reforma do Ensino Médio (BRASIL, 2017; MEC, 2018). O denominado “novo Ensino Médio” promove alterações como a redução da carga horária das disciplinas do núcleo comum de 2400h para 1800h; itinerários formativos em 4 eixos e em função do interesse e/ou habilidade do estudante; e incentivo a adoção de escolas em tempo integral.

Corroborando no sentido de medidas que visaram a alteração na legislação educacional, sobretudo no Ensino Médio, diversos trabalhos acadêmicos dos mais variados segmentos, que não poupam críticas ao modelo histórico até então existente. Fundamentam-se nos resultados ruins mensurados pelos órgãos de controle e já apresentados, além de outros desafios a serem suplantados (ZIBAS, 1992; ZIBAS, 2005; KRAWCZYK, 2011; COSTA, 2013).

2.2 O quantitativo de estudantes do Ensino Médio no Brasil

Conforme os dados do censo do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (INEP, 2018), dos 48 milhões de matrículas em 2017, 7,9 milhões são referentes ao Ensino Médio. A matrícula no ensino médio está dividida em 84,8% na Rede Estadual, 12,2% na Rede Privada, 0,6% na Rede Municipal e 2,4% na Rede Federal. Apenas 554.000 estudantes cursam o Ensino Médio integrado à Educação Profissionalizante. A Educação Básica conta com 2.192.224 docentes em 184.000 estabelecimentos de Ensino, sendo que 28.558

destas contam com a oferta do Ensino Médio. O Laboratório de Ciências, que no caso é o propenso a desenvolver atividades práticas de microbiologia, está presente em 45% delas. Os dados são para zona urbana e rural de todo o Brasil.

Vale destacar que a Rede Federal é composta por: Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia; Centros Federais de Educação Tecnológica; Escolas Técnicas Vinculadas às Universidades Federais; Universidade Tecnológica Federal do Paraná e; Colégio Pedro II.

Especificamente sobre a Rede Federal e no tocante as informações amplamente divulgadas pela mídia em geral, há uma série de interesses e contradições nas informações, o que por vezes, culmina em dificuldade de levantamento de alguns dados. Esta omissão já foi amplamente divulgada pela mídia. Em contrapartida, os estudantes da Rede Federal logram resultados em destaque no cenário nacional e internacional nos mais diversos exames, como no Enem (Exame Nacional do Ensino Médio) e Pisa (Programa Internacional de Avaliação de Estudantes), com resultados compatíveis aos estudantes de países de primeiro mundo (IFMG, 2016; O GLOBO, 2016).

Todavia, em 2018 foi criada a Plataforma Nilo Peçanha (PNP), a qual abarca dados exclusivos da Rede Federal de Ensino e que possibilitou a análise mais aprofundada da Rede Federal de Formação Profissional. Inclusive os dados informados por esta plataforma diferem do INEP quando comparados em um mesmo período. À título de exemplo, o número de matrículas é de 1.031.798 (PNP, 2018).

2.3 O PPC e o ementário

Como mecanismo operacional para canalizar todas as legislações e diretrizes a serem cumpridas para se obter êxito em um determinado curso, tem-se instituído em todos os cursos o Projeto Pedagógico de Curso (PPC).

Sua estrutura básica consiste em registrar os objetivos do curso, o perfil do egresso, a matriz curricular, o ementário, carga horária, normas para estágio e/ou TCC, diagnosticar a infraestrutura física e humana, dentre outros tópicos. Conforme Raposo e Maciel (2005) é fundamental a interação professor-professor para que se tenha um PPC bem consolidado e condizente aos objetivos do curso. Já para Veiga

(2003) a discussão sobre a elaboração do PPC no sentido de atribuir o êxito ou o erro do curso é de toda a comunidade acadêmica, a qual deverá ser a protagonista da construção do projeto, e recomenda ainda romper com a visão meramente burocrática, vindo a ter uma visão emancipatória e democrática com agregação da inovação para construção do PPC.

Assim, o ementário de uma dada disciplina, como um dos itens fundamentais a serem previstos no PPC, deve contemplar o objeto alvo da formação desejada para os estudantes, onde se faz a apresentação clara e objetiva do que se vai estudar, bem como ainda articular a contribuição desta com a área de conhecimento do curso.

2.4 O Ensino Profissionalizante no Brasil e a convergência do curso técnico de química com a microbiologia

Houve nos meados da virada do século duas regulamentações que foram decisivas na estagnação e na expansão das escolas técnicas federais. O decreto n.º. 2.208/97 coibia a integração do ensino médio com a formação técnica, ao passo que por força de outro decreto, no caso, o n.º5.154/04, houve a liberação desta fusão formativa (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004).

A Rede Federal Técnica saiu da inércia no tocante ao número de *campi* somente a partir do início do atual século, quando as 140 escolas técnicas federais construídas entre 1909 a 2002 entraram na fase de expansão, atingindo 644 *campi* em todo o país entre 2003 a 2018 (MEC, 2018).

Assim, a proposta dos IFs (Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia) no ano de 2008, em especial, perpassa pelo trabalho como “atividade criativa fundamental da vida humana e em sua forma histórica, como forma de produção. Essa compreensão é válida para qualquer atividade de Ensino, Extensão ou Pesquisa” (PACHECO, 2009).

À título de comparação, o modelo de educação da Finlândia, referência mundial em qualidade educacional, tem forte atuação no Ensino Médio com as unidades da *Vocational Upper Secondary School*, equivalente ao Ensino Técnico Integrado adotado pelo modelo brasileiro, atinge a 41,5% dos jovens matriculados

nessa faixa etária, graças ao vultoso investimento ao longo do tempo (ARAÚJO e SILVA, 2017). A se adotar este modelo como norteador de políticas educacionais no Brasil, percebe-se que há grande necessidade de investimentos, haja vista a baixa fração da população que tem acesso a este modelo (menos de 10%).

Todavia, construir um curso Técnico que seja realmente “integrado” é uma tarefa árdua e que envolve muito mais do que a livre cátedra. Conforme Machado (2009), a construção do currículo integrado “exige uma mudança de postura pedagógica; do modo de agir não só dos professores como também dos alunos, e uma ruptura com um modelo cultural que hierarquiza os conhecimentos”. Araújo e Frigotto (2015) destacam que a “articulação entre trabalho e ensino deve servir para formar homens onilaterais, ou seja, promover e desenvolver amplas capacidades humanas, intelectuais e práticas.” Esta compreensão é uma visão Marxista, no sentido do homem se superar e buscar minimizar as desigualdades pela educação.

Logo, para nortear a construção da integração, foi publicada as Diretrizes Curriculares para o Ensino Médio, estabelecidas pela Secretaria de Educação Básica do MEC, com destaque para os objetivos, a carga horária, o estágio e outras orientações norteadoras (MEC, 2012).

Mesmo com todos os esforços, a formação integrada ainda oferta poucas vagas mediante a demanda, conforme os dados já mencionados no presente trabalho.

No que se refere ao quantitativo de cursos técnicos disponíveis, na Rede Federal são ofertados 227 cursos Técnicos nas mais diferentes áreas do conhecimento. Especificamente quanto ao curso Técnico Integrado de Química, é ofertado por 65 *campi*, totalizando mais de 11.500 matrículas, com 3,3% destes matriculados no CEFET – Centro Federal de Formação Tecnológica (PNP, 2018). Todavia, a Microbiologia não é exclusividade curso supracitado, haja vista que o “Laboratório de Microbiologia” está presente como exigência mínima em outros 16 cursos (Técnico em Farmácia, Técnico em Biotecnologia, Técnico em Análises Clínicas e outros), além da possibilidade de perpassar por diversos outros cursos técnicos (Agroecologia, Cozinha e outros), pois estes requerem Laboratório de Biologia, Biologia Aquática, Alimentos e outros com a interface microbiológica (MEC, 2014).

Em pesquisa aleatória no site de pesquisa Google, buscou-se o PPC (Projeto Pedagógico de Curso) de 5 instituições da Rede Federal nas 5 diferentes regiões do país, sendo que para todos estes pesquisados e que ofertam o curso de Química, a disciplina de Microbiologia consta como componente da matriz curricular de todos, com aula prática ou não inserida na matriz, e com o número de duas (02) a quatro (04) aulas (IFSP, 2015; IFPE, 2014; IFG, 2015; IFAM, 2015; IFSC, 2018). Posto isto, é notória a importância do conteúdo da Microbiologia para a formação do Técnico em Química.

Corroborando nesta convergência o exposto pelo Catálogo Nacional de Cursos Técnicos (MEC, 2014), o qual menciona que o técnico em química deverá desenvolver a habilidade de trabalhar com amostragens microbiológicas e em laboratórios afins, como aqueles relacionados a microbiologia dos alimentos em indústrias e até mesmo no laboratório de tratamento de efluentes. O referido documento ainda menciona a necessidade da instituição adotar dentro da infraestrutura mínima para oferta do curso o Laboratório de Microbiologia.

Rebouças *et al.* (2005) reforça a necessidade de vincular a Química com outras áreas do conhecimento, entre elas a Biologia, que obviamente ancora a Microbiologia, pois há carência de profissional com formação técnica conectada às demandas da sociedade e das empresas.

Nesta toada da abordagem “prática e integrada”, a Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional menciona que os cursos devem primar por superar a organização curricular por disciplinas estanques e promover a interdisciplinaridade, sendo que a “educação profissional será desenvolvida em articulação com o ensino regular ou por diferentes estratégias de educação continuada, em instituições especializadas ou no ambiente de trabalho” (BRASIL, 1996).

Com a consolidação da Rede Federal a partir da criação dos Institutos Federais, potencializa-se a o cumprimento do objetivo anteposto referente a atuação no ambiente de trabalho, haja vista os IF's terem como premissa a atuação no tocante a estimular o desenvolvimento da economia local e regional com a atuação da tríade ensino, pesquisa e extensão (BRASIL, 2008).

Ademais, embora tratar-se de norma legislativa recente e pouco estudada, cabe ressaltar que a Microbiologia, como uma das áreas da Biologia, não recebeu amplo destaque no BNCC (Base Nacional Curricular Comum) (BRASIL, 2018),

embora a Microbiologia tenha se mostrado cada vez mais relacionada com questões de saúde, alimentos, meio ambiente, entre outras.

Os dados do Censo Escolar ratificam a tratativa secundária a qual a Microbiologia está inserida. De acordo com o Censo Escolar 2018, o item “Laboratório de Ciências” está presente em apenas 44,1% das escolas do Ensino Médio, sendo que a distribuição é muito oscilante entre as dependências administrativas. No caso, está presente em 83,4% das escolas Federais, 37,5% das escolas Estaduais, 28,8% das escolas Municipais e 57,2% das escolas Privadas (INEP, 2019a). Apesar dos dados computados serem notadamente reconhecidos como norteador de políticas públicas, cabe ressaltar que pode ocorrer certa subjetividade no preenchimento do Censo Escolar por parte dos estabelecimentos de ensino, em especial, quanto o aspecto qualitativo do que há de forma estruturada no laboratório de ciências. Neste sentido, Soares Neto *et al.* (2013) criaram um indicador para realizar a análise comparativa de infraestrutura das escolas brasileiras a partir dos dados do Censo Escolar de 2011. Os autores propuseram 4 categorias: Elementar, Básica, Adequada e Avançada. Apenas 0,6% das escolas Brasileiras se enquadram no padrão “avançado”, sendo que 52% das escolas Federais atendem a este critério. Acrescenta-se que a base de dados do INEP leva em consideração até mesmo questões como esgotamento sanitário, energia elétrica e outros no cômputo dos dados estruturais de uma escola.

2.5 O Ensino da Microbiologia nos diferentes níveis de Ensino

A Microbiologia é uma ciência derivada da Biologia, que tem por fundamento o estudo dos principais grupos microbianos (fungos, bactérias, protozoários, vírus, algas, dentre outros), e que despertam interesse em função do seu nicho ecológico contribuir de alguma forma com a sociedade e a natureza (SILVA e SOUZA, 2013). As primeiras contribuições de impacto datam do século VXIII, com a descoberta da varíola e ao longo deste íterim houve grandes avanços, e no século atual o avanço da microbiologia chegou até a Indústria 4.0, pois é uma das vertentes desta revolução a partir da aplicação da Biologia Sintética, a qual é conceituada como o uso da engenharia genética para “criar novos sistemas biológicos a partir de partes

biológicas, normalmente a partir da junção de organismos diferentes, conhecidos por “tijolos biológicos” (MADIGAN, *et al.*, 2016).

Do ponto de vista ainda conceitual, a Microbiologia é a ciência que estuda as “formas de vida diminutas individualmente muito pequenas para serem vistas a olho nu, os quais estão inclusos as bactérias, fungos (leveduras e fungos filamentosos), protozoários e algas microscópicas, além de vírus” (TORTORA *et al.*, 2012).

Estratégias das mais diversas para o Ensino da Microbiologia são utilizadas em todos os níveis de Ensino, dado o desafio cotidiano relatado por diversos autores. À título de exemplo, na Educação Básica, Barbosa e Oliveira (2015) trabalharam com estudantes do Ensino Fundamental e relatam o uso de ferramentas alternativas como desenvolvimento de vídeo didático, cultivo em placa com gelatina e caldo de carne, e por fim a aplicação de questionário diagnóstico. No Ensino Médio, Boas e Moreira (2012) avaliaram os livros didáticos utilizados por 334 estudantes, e concluíram que não há abordagem adequada sobre a importância da microbiologia agrícola e ambiental, o que possibilita uma ampla oportunidade para intervenções diversas, como palestras, workshops e aulas práticas. No Ensino Superior, Coswosk e Giusta (2015) relatam êxito na abordagem de um curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, onde os 46 participantes perceberam a viabilidade da aplicação da ferramenta utilizada pelos autores nas suas respectivas aulas. Há ainda iniciativas como o projeto proposto por Guimarães *et al.* (2016), onde desenvolveram aulas práticas, seminários e oficinas com estudantes de todos os níveis de ensino e com foco na microbiologia do cotidiano universitário e da iniciação científica.

Faz-se pertinente mencionar que os desafios para o ensino da Microbiologia não são exclusivos da educação brasileira e são enfrentados ao longo do tempo também em outros países. Outras instituições e sistemas de ensino, como na Inglaterra, demonstram a falta de atividades experimentais nos laboratórios de Ciências. Os autores extraíram os dados do Ministério da Educação do supracitado país (GARDINER e FARRAGHER, 1999). A baixa atratividade pelo conteúdo da Microbiologia e o papel marginal desta no âmbito dos currículos acadêmicos foram retratados por Caine *et al.* (2015), os quais vieram a desenvolver uma plataforma digital com a finalidade de expandir e tornar atrativo o ensino de Microbiologia. A mesma interatividade digital foi desenvolvida por CRIPPEN *et al.* (2013) nos EUA, onde

35 professores de 15 Estados utilizaram a plataforma para ensino de Ciências, inclusive uso de microscópios.

A interlocução entre a abordagem teórica e prática é discutida por alguns autores. Smaniotto (2015) obteve como resultado do seu trabalho sobre a prática profissional de do curso técnico de química do Instituto Federal Farroupilha que os temas são estudados, por vezes, de forma “superficial e sem contemplar a esperada dimensão dialógica entre formas diversificadas de conhecimento e ação”, mesmo que previstas no PPC (Projeto Pedagógico do Curso).

Nesta toada da abordagem “prática e integrada”, a Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional menciona que os cursos devem primar por superar a organização curricular por disciplinas estanques e promover a interdisciplinaridade, sendo que a “educação profissional será desenvolvida em articulação com o ensino regular ou por diferentes estratégias de educação continuada, em instituições especializadas ou no ambiente de trabalho” (BRASIL, 1996).

Com a consolidação da Rede Federal a partir da criação dos Institutos Federais, potencializa-se a o cumprimento do objetivo anteposto referente a atuação no ambiente de trabalho, haja vista os IF's terem como premissa a atuação no tocante a estimular o desenvolvimento da economia local e regional com a atuação da tríade ensino, pesquisa e extensão (BRASIL, 2008).

2.6 Práticas alternativas para Microbiologia

O contexto educacional no atual século, sobretudo, com o advento da Internet e da alta velocidade do fluxo das informações suscitam uma série de novos estudos sobre uma nova abordagem em sala de aula.

O uso das redes sociais, a capacitação dos profissionais, a aprendizagem móvel, a metodologia ativa, o uso de aplicativos, entre outras, compõem o rol de mudanças no cenário escolar (SANDE e SANDE, 2018; CAMARGO e DAROS, 2018; BERGMANN e SAMS, 2018).

O uso das redes sociais, a capacitação dos profissionais, a aprendizagem móvel, a metodologia ativa, o uso de aplicativos, entre outras, compõem o rol de mudanças no cenário escolar (SANDE e SANDE, 2018; CAMARGO e DAROS, 2018; BERGMANN e SAMS, 2018).

Apesar de todas as mudanças que naturalmente tendem a permear o ambiente escolar, a ampla menção encontrada na literatura sobre práticas alternativas para a Microbiologia conjectura intrinsecamente que há percalços a serem superados para cumprimento da proposta estabelecida via PPC, sobretudo, nas escolas públicas.

Métodos diversos são utilizados pelos docentes para promover a explicação de fenômenos a partir do uso de materiais alternativos e/ou formas de apreender a atenção dos estudantes para a Microbiologia, haja vista haver uma lacuna entre o que é exposto durante a explicação de um determinado conteúdo e a sua visualização/percepção por parte de quem nunca vivenciou a Microbiologia (POETINI, 2016, MEIRA et al., 2016).

Sande e Sande (2018) utilizaram o aplicativo de celular Kahoot para estimular e fixar o conteúdo mais essencial da disciplina de Microbiologia Industrial. Conforme os autores, a percepção dos estudantes é positiva por criar um ambiente de “competição como estímulo para o aprendizado”, com maior fixação do conteúdo.

Barbosa e Barbosa (2010) elencam em seu trabalho a utilização de materiais alternativos para aulas práticas de microbiologia, como panela de pressão em substituição a autoclave para esterilização por calor úmido, caixa de papelão acoplada a uma lâmpada com termostato a 37°C para simular uma estufa e corante de roupas para técnica de Gram.

Na falta de estrutura física adequada, o suporte oriundo de grandes centros acadêmicos pode ser uma boa alternativa de disseminação. Bôas et al., (2015) desenvolveu um projeto de Microbiologia do solo na Universidade Federal de Lavras, o qual contemplou a realização de diversas atividades práticas com estudantes do ensino médio de escolas da rede pública e privada do município. Os autores acrescentaram que os livros didáticos, em especial de Biologia, não abordavam o viés da microbiologia do solo. Cooperação semelhante ocorreu na Universidade do Estado da Bahia, sendo os estudantes do curso de graduação responsáveis pela condução de aulas práticas/experimentais com estudantes da rede pública Estadual. O projeto contou com a utilização de meios de cultura e visualização ao microscópio, e tinha por objetivo também suprir a carência desta temática na rede Estadual de ensino (ROMEIRO et al., 2016). Já a Universidade Estadual de Londrina (UEL) e o Instituto Federal do Paraná (IFPR) desenvolveram um projeto de extensão voltado para o ensino médio e técnico, e para tal foram

realizadas diversas atividades práticas. O questionário aplicada anteriormente à atividade e após a realização desta demonstrou a evolução da compreensão do conteúdo, o que ratifica a importância das aulas práticas para compreensão e capacitação técnica dos estudantes (KIMURA et al., 2013).

Em que pesem todos os esforços e alternativas empreendidas no sentido de contribuir com aulas atrativas de Microbiologia, não diferentemente importante tem-se o papel do docente responsável pela disciplina. O docente tem o papel peculiar de vislumbrar os cenários possíveis para agregar valor à sua aula e assim mediar os esforços em busca de opções metodológicas para suprir eventual carência estrutural e/ou profissional. No contingente de artigos relacionados a este assunto, há uma infinidade de opções, desde as abordagens já elencadas no presente trabalho, como também outras, que adotaram Blog, Laboratório Virtual e até mesmo a contextualização da Microbiologia no Enem, que certamente tal incremento contribuiu de alguma forma com a formação dos estudantes por ele assistidos (LEAL e SEPEL, 2017; SILVA, 2015; SODRÉ NETO e MEDEIROS, 2018).

Destarte, como já demonstrado, vários autores desenvolvem trabalhos na perspectiva de tornar as aulas de Microbiologia mais atrativas ou com o foco na formação docente e formação continuada. Moresco et al. (2017) realizaram experimentos envolvendo conhecimentos de microbiologia para 15 docentes de Ciências, os quais foram contemplados com um kit com material necessário para realização de experimentos nas escolas e com a cartilha de orientação. A partir dos dados coletados pelos autores, percebeu-se que a “maioria dos docentes não realiza aulas experimentais de microbiologia devido à falta de material, conhecimento e tempo para preparo e execução”. Bôas et al., (2018) constatou em seu trabalho de levantamento de dados sobre a atuação docente na disciplina de Microbiologia, que estes não foram qualificados para o uso de recursos audiovisuais, e embora os estudantes entendam que esta ferramenta possa facilitar o aprendizado, preferem aulas expostas em data show.

Por fim, é pertinente mencionar que para a existência desta perspicácia educativa por parte do Educador, a formação continuada e/ou a formação com vistas à realidade da docência em Microbiologia é um dos desafios existentes, pois raramente são encontrados esforços governamentais que incentivem esta política, ainda mais em área tão específica, como a microbiologia. Porém, como citado por Moresco et al. (2017), a formação continuada é fundamental para suprir a lacuna

didática e os “obstáculos inerentes ao próprio processo de construção dessa disciplina”.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Elaborar roteiros de aulas práticas da disciplina “Laboratório de Microbiologia Industrial” conforme ementário estabelecido no PPC do curso Técnico de Química, no CEFET *campus* Timóteo.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Apresentar os desafios do ensino de Microbiologia nos níveis de ensino;
- b) Estimar o custo para a implantação do laboratório de Microbiologia conforme ementário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A disciplina do “Laboratório de Microbiologia Industrial” é o objeto alvo desta proposta, que é a elaboração dos roteiros de aulas práticas para todos os itens do ementário. Os roteiros serão divididos em dois formatos: a) formato para o professor, o qual contemplará a explicação detalhada do roteiro, exercícios com respostas e atividades complementares propostas; b) formato para o estudante, o qual constará o roteiro da atividade, sem respostas e explicações contidas no roteiro do professor. Complementarmente, serão discutidos os desafios e possibilidades para o cumprimento do ementário estabelecido no PPC, que foi revisado pelo corpo acadêmico do CEFETMG *campus* Timóteo, em 2016. Será utilizada a pesquisa bibliográfica para realizar esta proposta nas bases de dados Google Acadêmico, Periódicos Capes e outros materiais disponibilizados pelas Universidades, de forma a serem adequados ao Ensino Médio Técnico.

Já para mensuração dos custos para a devida estruturação de um laboratório de nível técnico para Microbiologia, dar-se-á a partir do levantamento de preços no mercado e a partir dos materiais e equipamentos mencionados nos roteiros de aula prática, bem como a partir do diagnóstico da estrutura já existente no *campus*.

Já a identificação do risco microbiológico e principais sinalizações de riscos aos usuários, além de novo *layout* para o laboratório, serão norteadas a partir da norma vigente, no caso, elaborada pela Comissão de Biossegurança do Ministério da Saúde e instituída pela Portaria n°. 2349/2017 (BRASIL, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico da estrutura do Laboratório de Microbiologia

A disciplina de Microbiologia no CEFET *campus* Timóteo é contemplada com 2 aulas teóricas e 2 aulas práticas semanais, denominadas “Microbiologia Industrial” e “Laboratório de Microbiologia Industrial”, respectivamente.

O *campus* dispõe de 4 laboratórios (A, B, C, D) com dimensões de 6 x 8m, com bancada central, pias nas extremidades, armários e ar condicionado (figura 1). O laboratório “C” é utilizado para as aulas de microbiologia, mas não é de uso exclusivo, haja vista ser utilizado por outras disciplinas da área de Química. Percebe-se que do ponto de vista da estrutura física, as instalações são de forma geral adequada.

Figura 1 – Laboratório utilizado para aulas de Microbiologia



Fonte: autor (2018)

Já em relação aos equipamentos, vidrarias e reagentes há séria limitação, sobretudo, quanto aos microscópios. Há 3 equipamentos destes, sendo que apenas um (01) encontra-se em condições de uso. A estufa bacteriológica está danificada, bem como uma (01) das duas autoclaves existentes. Há 8 meios de cultura disponíveis, mas todos com data de vencimento superada por até 4 anos. Tubos de ensaio e placas de Petri não chegam a 10 unidades.

Os principais equipamentos e insumos existentes no laboratório estão listados no apêndice 1, mas embora não exista todos os equipamentos e/ou insumos desejados para o cumprimento de algum roteiro de aula prática, entende-se que é possível fazê-lo de forma parcial ou adequá-lo de alguma forma, cumprindo assim a

proposta da compreensão do conteúdo. Adicionalmente e especificamente quanto a compra pública, esta deve ser realizada em conjunto entre campi ou instituições, haja vista que em muitos casos há a venda mínima de determinados itens, que podem ser excessivos para o uso de um único laboratório, além de ser possível reduzir o custo da compra. À título de exemplo, Pipeta Pasteur são vendidas em sacos com 500 unidades.

Assim posto, embora com estrutura física favorável ao desenvolvimento das aulas, há sérias limitações para que se atinja, na devida profundidade conceitual e demonstrativa, a proposta do ementário. Como já discutido, estas limitações ocorrem em toda a educação brasileira, mas há possibilidades tangíveis para superar estes obstáculos, como aulas com metodologia e uso de insumos alternativos, empréstimo de equipamentos e até mesmo meios para buscar recursos financeiros para compra de equipamentos, principalmente via edital de pesquisa, apesar das limitações econômicas atuais no Brasil.

5.2 Roteiros de aula prática conforme ementário

A partir do diagnóstico da estrutura física e laboratorial existente, e com o ementário da disciplina do Laboratório de Microbiologia Industrial (anexo 2), procedeu-se a elaboração de cada um dos roteiros de aulas práticas conforme o ementário. Assim, foi elaborado o roteiro para o “professor”, o qual dispõe de material explicativo, exercícios propostos com respostas e atividades complementares. O formato padrão de cada roteiro de aula é dividido em: título, objetivos, método, duração das aulas, abordagem conceitual, exercícios e referências bibliográficas. Figuras e/ou tabelas ilustram e elucidam o roteiro, conforme consta no apêndice 2. Já o roteiro com formato para os “estudantes” é similar ao roteiro do formato do “professor”, mas sem algumas explicações explícitas, de forma a não induzir o estudante, bem como a ausência das respostas dos exercícios. O formato “estudante” consta no apêndice 3.

Foram elaborados 30 roteiros de aulas práticas, os quais juntamente com atividades de duas visitas técnicas (Laticínios Funarbe da Universidade Federal de Viçosa e Laboratório de Microbiologia do curso de Biomedicina da Universidade

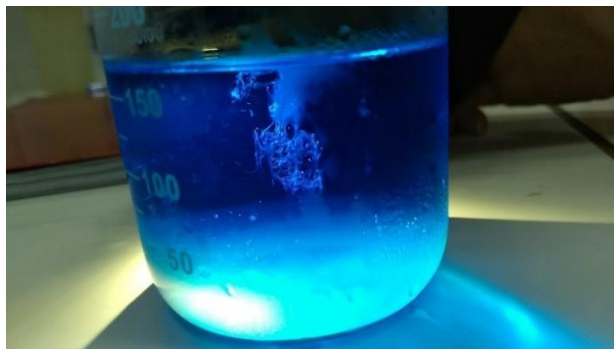
Única – *campus* Ipatinga) e uma palestra com colaborador externo, no caso, bioquímico do hospital da cidade para demonstrar a rotina do laboratório e diagnóstico microbiológico, haja vista o impedimento da visita *in loco* por questões de segurança impostas pelos laboratórios consultados.

No tocante aos roteiros de aula prática estes cumpriram com o objetivo de cada conteúdo abordado, em menor ou maior grau de qualidade, em função de todas as limitações já elencadas. Todavia, vale ressaltar que a formulação destes roteiros é de fundamental aplicação para aulas nos anos letivos vindouros, os quais devem ser aperfeiçoados à medida do possível e, ainda, podem ser utilizados por outros cursos técnicos com abordagem correlata. O roteiro de aula é importante para cumprir o planejamento e oferecer um direcionamento ao conteúdo abordado, que conforme diversos autores compreender uma etapa essencial do êxito acadêmico (QUADROS e MORTIMER, 2016; MARINHO et al., 2015).

Sobre a realização de palestras e visitas técnicas, em especial este último, diversos autores destacam que se trata de realização fundamental para a formação profissional do Ensino Médio, pois é o momento de contato direto com o trabalho que poderão desenvolver no futuro. É também um momento de divulgação da pesquisa e com conotação social, principalmente quando há visitas em laboratórios de pesquisa científica (HARRISON e LIMA, 2010; WATANABE e KAWAMURA, 2015).

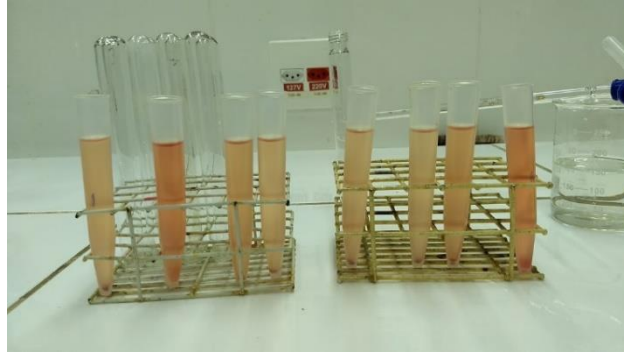
Assim, os conjuntos das atividades desenvolvidas, em especial, os roteiros de aula prática, perfizeram todo o ementário. Abaixo são apresentadas as figuras 2 a 9, as quais contemplam alguma das atividades práticas que foram realizadas conforme o roteiro e as visitas técnicas.

Figura 2 – Atividade de extração do DNA da cebola



Fonte: autor (2018)

Figura 3 – Efeito osmótico em sangue bovino



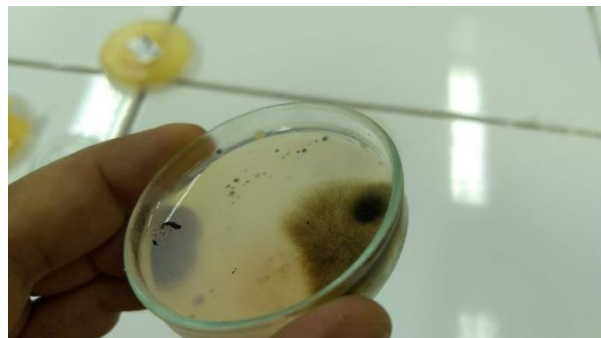
Fonte: autor (2018)

Figura 4 – Preparação do iogurte de Kefir



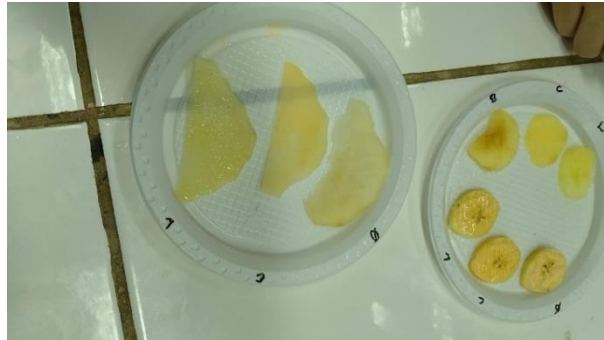
Fonte: autor (2018)

Figura 5 – Cultivo de amostra de compostagem de resíduo doméstico em placa de Petri com Meio de cultura Ágar-Ágar



Fonte: autor (2018)

Figura 6 – Oxidação enzimática de alimentos



Fonte: autor (2018)

Figura 7 – Preparação de queijo com uso do Coalho



Fonte: autor (2018)

Figura 8 – Visita na Fábrica de Laticínios Funarbe - UFV



Fonte: autor (2018)

Figura 9 – Visita no Laboratório de Microbiologia da Universidade Única – *campus* Ipatinga



Fonte: autor (2018)

Outra ação proposta foi a alteração do *layout* do Laboratório com vistas a otimizar a realização das análises e segurança dos envolvidos. O apêndice 4 apresenta o novo *layout* e a disposição dos equipamentos. A sala tem 48m², com uma bancada central e pias dispostas nas extremidades da bancada. Há ainda 3 salas de apoio, as quais foram adequadas para 3 finalidades: a) pesagem com balança de precisão (já adotado anteriormente); b) alimentos; c) microscopia e reagentes.

A norma Brasileira instituída pela portaria da Anvisa (Agência de Vigilância Sanitária) classifica os laboratórios em 4 graus de risco de Biossegurança, variável em função das atividades empenhadas (BRASIL, 2010). Sangioni et al. (2013) em trabalho realizado sobre os laboratórios de microbiologia e parasitologia nas universidades brasileiras, sugere que medidas de segurança devem ser priorizadas nos laboratórios, haja vista a necessidade para adequação dos procedimentos operacionais para a manipulação de agentes biológicos patogênicos em função das novas tecnologias, de forma a garantir a segurança dos profissionais, acadêmicos e até do meio ambiente.

Assim, somadas às condições físicas e de planejamento do conteúdo, não menos importante é a formação docente ou a formação continuada para alguns casos. É inegável que a habilidade para contornar os desafios impostos para o Ensino da Microbiologia perpassa pelo conhecimento e esmero para realização de todas as atividades. Uma das formas de agregar valor a estas aulas é a formação continuada nas suas mais variadas formas. A literatura é farta quanto a atribuição de atribuir aos coordenadores pedagógicos o protagonismo na formação continuada, mas normalmente não é o que ocorre (ALMEIDA e PLACCO, 2014). Já para Ferrari

Júnior e Rink (2018) a formação continuada por meio de cursos EaD (Ensino à Distância) oferece a vantagem de compartilhar o conhecimento com docentes de Escolas Profissionais de Nível Técnico em função da facilidade de gestão do tempo, todavia, há limitações quanto ao suporte dos tutores.

Por fim, o exposto no presente trabalho está longe de esgotar as possibilidades e oportunidades concernentes à curva de aprendizado que dar-se-á doravante à ministração das aulas da disciplina de Laboratório de Microbiologia Industrial.

5.3 Custos para instalação do Laboratório de Microbiologia Industrial

As atividades práticas em Microbiologia são fundamentais para a compreensão dos fenômenos existentes, mas também em função do público, que por natureza da jovialidade, apresentam muitas curiosidade e ansiedade, até mesmo pela visão abstrata que os estudantes apresentam sobre os microrganismos, além da percepção mais estritamente deletéria destes (ANTUNES *et al.*, 2012).

Notadamente, os custos para realização das aulas práticas de Microbiologia apresentaram considerada elevação dos preços, até mesmo porque muitos dos produtos comercializados são via comércio internacional, como meios de cultura e até equipamentos, assim, até oscilações cambiais interferem nos valores (BARBOSA e BARBOSA, 2010).

Desta forma, o emprego de materiais alternativos emerge como alternativa para compreensão dos processos microbiológicos. Vários autores

Em que pesem as mais diversas alternativas para fins didáticos a partir do uso de métodos e materiais alternativos para as aulas de Microbiologia, há de se considerar 2 aspectos importantes: a) o conceito da Ciência como algo reprodutível e confiável; b) o contexto do mundo do trabalho, o qual o estudante egresso provavelmente estará inserido em uma empresa que utiliza a tecnologia aceita e válida, ou seja, meios de cultura, equipamentos e protocolos consagrados.

Sob esta ótica, embora os materiais alternativos possibilitem a compreensão dos fenômenos, o manuseio das técnicas e equipamentos clássicos (vidrarias, autoclave, meios de cultura, assepsia laboratorial e outras) capacita o estudante

para a realidade de mercado. A própria LDB, no artigo 36, elenca que “a oferta de formação com ênfase técnica e profissional considerará a inclusão de vivências práticas de trabalho no setor produtivo ou em ambientes de simulação, inclusive por meio de parcerias” (BRASIL, 1996).

Apesar da vocação da formação técnica, nem sempre os egressos culminam imediatamente no mercado de trabalho. Estudos para acompanhamento do egresso são por vezes limitados, pois nem sempre é possível estabelecer o vínculo institucional e assim averiguar a atuação. Ainda assim, no Instituto Federal de Minas Gerais, *campus* Governador Valadares, o acompanhamento de duas turmas de dois cursos Técnicos Integrados finalizados em 2016 (Técnico em Meio Ambiente e Técnico em Segurança do Trabalho), com 25 e 27 estudantes, respectivamente, chegou ao resultado expresso nas tabelas 1 e 2 abaixo. É possível inferir o alto aproveitamento em instituições Federais e por vezes a aprovação em até 2 instituições, e nos mais diferentes cursos, ou seja, não seguiram a verticalização ou Área Acadêmica cursada no Ensino Médio. Neste recorte observa-se ainda que nenhum estudante ingressou no mercado de trabalho, 29 foram aprovados em Universidades Federais e/ou particulares, 9 estudantes foram aprovados em Universidades Particulares, 11 estudantes não foram aprovados nos cursos desejados e 5 estudantes seguem sem informações.

Tabela 1 – Dados dos egressos de 2016 do Curso Técnico de Meio Ambiente

ENSINO FUNDAMENTAL	APROVAÇÃO UNIVERSITÁRIA	CURSO SUPERIOR
Maior parte Escola Pública	NÃO	
Maior parte Escola Pública	IFMG / UVV / UNIVALE	Eng. de Produção / Eng. Civil
Somente Escola Pública	IFES - VITÓRIA	Letras
Maior parte Escola Pública	UNIFEI	Engenharia Mecânica
Somente Escola Pública	NÃO	
Somente Escola Pública	UNIVALE	Arquitetura e Urbanismo
Somente Escola Pública	NÃO	
Maior parte Escola Particular	UNIFEI	Engenharia Mecânica
Somente Escola Particular	FADIVALE	Direito
Somente Escola Particular	NÃO	
Somente Escola Pública	UFVJM / IFMG	Agronomia
Somente Escola Pública	NÃO	
Somente Escola Pública	NÃO	
Somente Escola Pública	--	
Maior parte Escola Particular	PITÁGORAS	Engenharia Mecânica
Somente Escola Pública	UFJF - Juiz de Fora	Nutrição
Somente Escola Pública	NÃO	
Maior parte Escola Pública	UFJF - Juiz de Fora	Direito
Somente Escola Particular	UFPEL	Antropologia
Somente Escola Particular	UFES	Engenharia de Petróleo
Somente Escola Particular	UNIPAMPA	Relações Públicas
Somente Escola Pública	UFJF / UNIVALE	Nutrição e Direito
Somente Escola Pública	UFJF - Juiz de Fora	Ciências Econômicas
Somente Escola Particular	UNIFEI / UFES	Eng. Mecânica/Eng. Computação
Somente Escola Pública	NÃO	

Fonte: IFMG GV (adaptado), 2019

Tabela 2 – Dados dos egressos de 2016 do Curso Técnico de Segurança do Trabalho

ENSINO FUNDAMENTAL	APROV. UNIVERSIDADE	CURSO
Somente Escola Particular	UFJF - GV	Odontologia
Somente Escola Particular	UNIFEI	Engenharia Elétrica
Maior parte Escola Particular	UNIVALE	Engenharia Civil e Ambiental
Somente Escola Pública	UFF	Matemática
Somente Escola Pública	---	
Somente Escola Particular	UFES	Sistema de Informação
Somente Escola Pública	MULTIVIX	Odontologia
Somente Escola Pública	IF SUDESTE RIO POMBA	Ciência da Computação
Maior parte Escola Pública	UFJF-GV / UNIVALE-PROUNI	Contábeis/Eng. Civil e Amb.
Maior parte Escola Particular	IFMG - VALADARES	Engenharia de Produção
Somente Escola Particular	UFOP	Sistemas de Informação
Somente Escola Particular	UNIVALE / UFJF - GV	Odontologia
Somente Escola Pública	UFBA	Letras
Somente Escola Particular	PITÁGORAS	Engenharia Mecânica
Somente Escola Pública	UFMG	Matemática
Somente Escola Pública	NÃO	
Maior Parte Escola Particular	UFJF - GV	Ciências Econômicas
Somente Escola Particular	UFG / UNB	Med. Veterinária e Biomedicina
Somente Escola Pública	PITÁGORAS	Arquitetura e Urbanismo
Somente Escola Particular	NÃO	
Somente Escola Pública	UFTM	Ciências Biológicas
Somente Escola Particular	---	
Somente Escola Pública	UFLA	Engenharia
Somente Escola Pública	---	
Maior Parte Escola Pública	UFJF - Juiz de Fora	Psicologia
Maior Parte Escola Pública	UNIVALE	Engenharia Civil
Somente Escola Particular	NÃO	
Somente Escola Particular	---	-

Fonte: IFMG GV (adaptado), 2019

Outros trabalhos também retratam a dificuldade de obter dados atualizados dos egressos, todavia, ainda assim apresentam números interessantes para análise. É o caso do trabalho de Sampaio e Almeida (2013), envolvendo 144 estudantes formados entre 2005 e 2006 na modalidade subsequente (estudantes que já concluíram o ensino médio), onde 61% estão no mercado de trabalho na área vinculado ao curso de formação técnica, mas no bojo da formação oferecida estes estudantes também anseiam pela preparação para a sequência acadêmica de nível superior.

No tocante aos desafios orçamentários a serem superados pelas instituições de ensino, a formação de estudantes a partir de uma realidade de ensino laboratorial mais aproximada da realidade seria o ideal. Contudo, ao menos nas Escolas Técnicas o acesso a recursos financeiros para compra de equipamentos dar-se de diferentes formas, como por meio de licitação ou nos editais de pesquisa para financiamento de projetos, que podem variar de acordo com a disponibilidade orçamentária. No ano de 2014 o valor de cada projeto contemplado chegava a R\$25.000,00, todavia, a crise financeira limitou ainda mais a publicação desta modalidade de edital (CEFETMG, 2014). Há ainda editais que são regularmente publicados por agências de fomento, como a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (FAPEMIG, 2019). A submissão de projetos para obtenção destes recursos deve ser fomentada na instituição escolar.

A partir do ementário e do roteiro de aulas práticas, foi relacionado os principais materiais permanentes e de consumo para o Laboratório de Microbiologia Industrial, considerado para nível de Biossegurança 2 e para a formação técnica pretendida, de forma a se obter o custo aproximado para a instalação e utilização para 3 anos letivos de atividades de Ensino. Para tal, foi desconsiderado os custos com a estrutura física (obra civil). Com o orçamento realizado em empresas renomadas no Brasil e com expertise na venda de produtos laboratoriais, chegou-se ao valor de R\$153.980,90, sendo que o detalhamento consta no apêndice 1. Vale destacar que o custo inicial é elevado, mas para fins estritamente didáticos os insumos como um todo podem ter durabilidade de 2 ou 3 anos, como por exemplo os meios de cultura. Não obstante, o laboratório em questão tem a finalidade de formação técnica profissional, o que culminará em custo superior em detrimento de um laboratório de microbiologia com finalidade apenas didática, para o mesmo nível de ensino ou não.

A proposta de se estabelecer o padrão de “Laboratório de Microbiologia” corrobora com o estudo proposto por Soares Neto *et al.*(2013), pois minimiza a avaliação dos dados censitários do INEP, por exemplo, quando no ato de obtenção dos dados em cada estabelecimento escolar. O glossário do Censo Escolar 2018 define “laboratório de ciências” como (INEP, 2019b):

“Espaço com características e equipamentos próprios, destinado à demonstração ou realização de exames, análises, simulações, testes, ensaios,

medições, entre outros, que contribuem para investigações científicas e atividades experimentais nas diversas áreas: física, química, biologia”.

Assim, a partir de uma estrutura padronizada, torna-se os dados coletados mais fidedignos quanto o significado da escola dispor ou não de um “laboratório de ciências” com a devida infraestrutura adequada. O MEC (Ministério da Educação) disponibiliza o modelo de 27 laboratórios para os mais distintos cursos técnicos, todavia, não há menção para o laboratório de Microbiologia, mas os laboratórios de Biologia, Análises Químicas e Química são os mais correlatos (MEC, 2019), apesar da relação de equipamentos, insumos e vidrarias ser bem inferior ao mencionado no apêndice 1, com vistas ao cumprimento do ementário.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos percalços do cotidiano escolar, foi possível cumprir todo o ementário da Disciplina a partir dos 30 roteiros de aulas práticas, pois há uma gama de possibilidades de atividades práticas disponíveis para ser ajustada a cada realidade escolar, o que no presente caso certamente contribuiu para a compreensão dos conceitos e das técnicas laboratoriais de Microbiologia.

Em que pesem as mais diversas possibilidades didáticas para fins de demonstração dos conceitos e compreensão dos temas abordados, o nível de formação profissional técnica requer o uso dos materiais mais próximos possíveis à realidade do mundo do trabalho do profissional da área técnica de microbiologia, de forma que o estudante tenha maior compreensão da realidade e produtividade no mercado, e que por isto, justifica-se a necessidade do investimento mensurado (R\$153.980,90). Ademais, os custos para infraestrutura laboratorial da disciplina de Laboratório de Microbiologia Industrial não são tão expressivos diante do ganho de qualificação profissional proposta para o Ensino Técnico Profissionalizante.

Não menos importante, a formação continuada é de suma importância para que os desafios sejam superados dentro das realidades das escolas públicas do Brasil, em especial.

Por fim, cabe salientar que o presente roteiro com está longe de esgotar as possibilidades de aprofundamento conceitual e/ou mesmo representar uma forma singular de desenvolver os conteúdos propostos, haja vista existir uma gama de experimentos correlatos para cada um dos itens do ementário em análise.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. R.; PLACCO, V. M. N. S. Formação continuada de professores no contexto de trabalho: do prescrito ao executado. **Revista @ambienteeducação**. Universidade Cidade de São Paulo. 2014. Disponível em: < <http://publicacoes.unicid.edu.br/index.php/ambienteeducacao/article/view/497/473> >. Acesso: 12 Dez. 2018.
- ARAÚJO, A. C.; SILVA, C. N. N. **ENSINO MÉDIO INTEGRADO NO BRASIL: FUNDAMENTOS, PRÁTICAS E DESAFIOS**. Adilson César Araújo e Cláudio Nei Nascimento da Silva (orgs.) – Brasília: Ed. IFB, 2017. 569 p. Disponível em: < http://www.anped.org.br/sites/default/files/images/livro_completo_ensino_medio_integrado_-_13_10_2017.pdf >. Acesso: 27 Nov. 2018.
- ARAÚJO, R. M. L.; FRIGOTTO, G. Práticas pedagógicas e ensino integrado. **Revista Educação em Questão**. 2015. Disponível em: < <https://periodicos.ufrn.br/educacaoemquestao/article/view/7956/5723> >. Acesso: 27 Nov. 2018.
- BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. Alternativas metodológicas em Microbiologia - viabilizando atividades práticas. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, V. 10, n. 2. 2010. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/html/500/50016922015/> >. Acesso: 04 Nov. 2018.
- 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. **Revista de Ensino, Educação e Ciências Humanas**. Londrina-PR. 2015. Disponível em: < <http://www.pgsskroton.com.br/seer/index.php/ensino/article/view/326/304> >. Acesso: 18 Nov. 2018.
- BERGMANN, J.; SAMS, A. **Sala de aula invertida: uma metodologia ativa de aprendizagem**. Tradução: Afonso Celso da Cunha Serra. 1ª ed. Rio de Janeiro - RJ: LTC. 104p. 2018.
- BÔAS, R. C. V.; et al.. ATIVIDADES LABORATORIAIS DE MICROBIOLOGIA DO SOLO: UMA PROPOSTA PARA O ENSINO DE BIOLOGIA NO NÍVEL MÉDIO. **Revista Ciências e Ideias**. 2015. Disponível em: < <http://revistascientificas.ifrj.edu.br:8080/revista/index.php/reci/article/view/375/342> >. Acesso: 28 Nov. 2018.
- BÔAS, R. C. V.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. F.; MOREIRA, F. M. S. Utilização de recursos audiovisuais como estratégia de ensino de Microbiologia do Solo nos ensinos fundamental II e Médio. **Revista Praxis**, v. 10, n. 19. 2018. Disponível em: < <http://revistas.unifoa.edu.br/index.php/praxis/article/view/691/1803> >. Acesso: 27 MNov. 2018.

BRASIL. **LEI Nº 11.892, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2008**. Institui a Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica, cria os Institutos Federais de Educação, Ciência e Tecnologia, e dá outras providências. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11892.htm >. Acesso: 25 Out. 2018.

BRASIL. **DECRETO Nº 2.208, DE 17 DE ABRIL DE 1997**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D2208.htm >. Acesso em: 18 Nov. 2018.

BRASIL. Decreto nº 5.154, de 23 de julho de 2004. Regulamenta o § 2º do art. 36 e os artigos 39 a 41 da Lei nº 9.394, de 20 de dezembro de 1996. Regulamenta a Educação Profissional. 2004. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Decreto/D5154.htm >. Acesso: 18 Nov. 2018.

BRASIL. **Lei 9394, de 20 de dezembro de 1996**. Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional. Diário Oficial [da União], Brasília, 23 dez. 1996. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9394.htm >. Acesso em: 25 Out. 2018.

BRASIL. **Nova Lei do Ensino Médio**. Lei n.º13415/2017. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/l13415.htm >. Acesso em: 15 Nov. 2018.

BRASIL. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 44p. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao_risco_agentes_biologicos_2ed.pdf >. Acesso: 18 de Nov. 2018.

BRASIL. **Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos elaborada em 2017, pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS), do Ministério da Saúde**. PORTARIA Nº 2.349, DE 14 DE SETEMBRO DE 2017. 2017. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt2349_22_09_2017.html >. Acesso: 13 Dez. 2018.

CAINE, M.; et al. BiOutils: an interface to connect university laboratories with microbiology classes in schools. **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 362, 2015. Disponível em: < <https://academic.oup.com/femsle/article/362/20/fnv171/544527> >. Acesso: 23 Fev. 2019.

CAMARGO, F.; DAROS, T. **A sala de aula inovadora: estratégias pedagógicas para fomentar o aprendizado ativo**. Porto Alegre – RS: Penso. 123p. 2018.

CEFET MG. Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Edital de Pesquisa interno. Disponível em: < <http://www.dppg.cefetmg.br/wp-content/uploads/sites/164/2018/04/PROPESQ-No.-185-14-2015-2016.pdf> >. Acesso: 01 Fev. 2019.

- COSTA, G. L. M. O ensino médio no Brasil: desafios à matrícula e ao trabalho docente. **Revista Brasileira de Estudos Pedagógicos**. Brasília – DF. 2013. Disponível em: < <http://www.emaberto.inep.gov.br/index.php/rbep/article/viewFile/395/384> >. Acesso: 26 Nov. 2018.
- COSWOSK, E. D.; GIUSTA, A. S (in memoriam). PRÁTICAS INVESTIGATIVAS NO ENSINO DE MICROBIOLOGIA: UMA PROPOSTA METODOLÓGICA PARA INICIAÇÃO À PESQUISA. **Revista Investigações em Ensino de Ciências**. 2015. Disponível em: < <https://www.if.ufrgs.br/cref/ojs/index.php/ienci/article/view/41/19> >. Acesso: 18 Nov. 2018.
- CRIPPEN, L. M.; ARCHAMBAULT, L. M.; KERN, C. L. The Nature of Laboratory Learning Experiences in Secondary Science Online. **Research in Science Education**, vol. 43, 2013. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11165-012-9301-6> >. Acesso: 25 Fev. 2019.
- FAPEMIG. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Edital de Pesquisa com recursos financeiros e possibilidade para aquisição de equipamentos. Disponível em: < https://fapemig.br/pt/chamadas_abertas_opportunidades_fapemig/ >. Acesso: 02 Fev. 2019.
- FERRARI JÚNIOR, J. RINK J. A FORMAÇÃO CONTINUADA EAD PARA A EDUCAÇÃO PROFISSIONAL TÉCNICA DE NÍVEL MÉDIO: UM OLHAR PARA AS CONCEPÇÕES DE DOCENTES. **Congresso Internacional de Educação e Tecnologias. Encontro de pesquisadores de Educação à Distância**. 2018. Disponível em: < <http://cietenped.ufscar.br/submissao/index.php/2018/article/view/569/98> >. Acesso: 13 Dez. 2018.
- GARDINER, P, G.; FARRAGHER, P. The Quantity and Quality of Biology Laboratory Work in British Columbia High Schools. **Biology Lab. Work in British Columbia**. 1999. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1949-8594.1999.tb17474.x> >. Acesso: 23 Fev. 2019.
- GUIMARÃES, V. B. S.; et al.. DA ESCOLA À UNIVERSIDADE: AÇÕES EDUCATIVAS DO PROJETO MICROBIOTA - EXPLORANDO UM MUNDO INVISÍVEL. **Revista Expressa Extensão**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2016. Disponível em: < <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/expressaextensao/article/view/7893/7025> >. Acesso: 18 de nov. 2018.
- HARRISON, K. M. P.; LIMA, A. P. **Visitas Técnicas: interação escola-empresa**. Curitiba: Editora CRV, 2010, 265p. BAKHTINIANA, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 166-168. 2010 (fragmento de texto). Disponível em: < [file:///C:/Users/flaviobarony/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosofEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/3379-7654-2-PB%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/flaviobarony/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosofEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/3379-7654-2-PB%20(2).pdf) >. Acesso: 12 Dez. 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil em Síntese. 2018. Disponível em: < <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/educacao/taxa-de-analfabetismo-das-pessoas-de-15-anos-ou-mais.html> >. Acesso: 15 Nov. 2018.

IFAM – Instituto Federal do Amazonas. Curso Técnico de Nível Médio Integrado de Química. 2015. Disponível em: <

<http://www2.ifam.edu.br/campus/cmc/arquivos/cursos/tecnico/quimica/disciplinas-e-carga-horaria-integrado> >. Acesso: 03 Nov. 2018.

IFMG – Instituto Federal de Minas Gerais. Institutos federais alcançam média similar à de países desenvolvidos em exame internacional. 2016. Disponível em: <

<https://www2.ifmg.edu.br/portal/noticias/alunos-de-institutos-federais-alcancam-media-de-paises-desenvolvidos-em-exame-internacional> >. Acesso: 29 Out. 2018.

IFSC – Instituto Federal de Santa Catarina. Matriz curricular do Curso Técnico Integrado de Química. 2018. Disponível em: <

<https://sig.ifsc.edu.br/sigaa/link/public/curso/curriculo/3564230> >. Acesso: 03 Nov. 2018.

IFSP – Instituto Federal de São Paulo. PROJETO PEDAGÓGICO DO CURSO TÉCNICO INTEGRADO EM QUÍMICA. *Campus Suzano – SP*. 2015. Disponível em: <

http://szn.ifsp.edu.br/portal2/arquivos/artigos/374/ppc_quimica_integrado.pdf >. Acesso: 03 Nov. 2018.

IFPE - INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLÓGICA DE PERNAMBUCO – CAMPUS RECIFE. PLANO DO CURSO TÉCNICO EM QUÍMICA INTEGRADO. 2014. Disponível em: <

https://portal.ifpe.edu.br/campus/recife/cursos/tecnicos/integrados/quimica/projeto-pedagogico/ppc-quimica-integrado_2014-recife.pdf >. Acesso: 03 Nov. 2018.

IFG – Instituto Federal de Goiás – *campus Itumbiara*. Curso Técnico Integrado em Química. 2015. Disponível em: < <http://cursos.ifg.edu.br/info/tecint/tecnico-quimica/CP-ITU> >. Acesso: 03 Nov. 2018.

INEP. Mapa do Analfabetismo no Brasil. 2004. Disponível em: <

http://portal.inep.gov.br/informacao-da-publicacao/-/asset_publisher/6JYIsGMAMkW1/document/id/485756 >. Acesso: 15 Nov. 2018.

INEP - Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira. Censo Escolar 2017: notas estatísticas. 2018. Disponível em: <

http://download.inep.gov.br/educacao_basica/censo_escolar/notas_estatisticas/2018/notas_estatisticas_Censo_Escolar_2017.pdf >. Acesso: 29 out. 2018.

INEP - Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira. Censo Escolar 2018: notas estatísticas. 2019a. Disponível em: <

http://download.inep.gov.br/educacao_basica/censo_escolar/notas_estatisticas/2018/notas_estatisticas_censo_escolar_2018.pdf >. Acesso: 22 Fev. 2019.

- INEP - Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira. Resumo Técnico: Censo da Educação Básica 2018 [recurso eletrônico]. – Brasília: 2019b. Disponível em: < http://portal.inep.gov.br/informacao-da-publicacao/-/asset_publisher/6JYIsGMAMkW1/document/id/6386080 >. Acesso: 22 Fev. 2019.
- KIMURA, A. H. et al.. MICROBIOLOGIA PARA O ENSINO MÉDIO E TÉCNICO: CONTRIBUIÇÃO DA EXTENSÃO AO ENSINO E APLICAÇÃO DA CIÊNCIA. **Revista Conexão UEPG**. 2013. Disponível em: < <http://177.101.17.124/index.php/conexao/article/view/5516/3664> >. Acesso: 28 Nov. 2018.
- LEAL, A. J.; SEPEL, L. M. A INCLUSÃO DIGITAL NO ENSINO DE CIÊNCIAS: ANALISANDO LABORATÓRIOS VIRTUAIS DE APRENDIZAGEM. **Tear: revista de Educação, Ciência e Tecnologia**. 2017. Disponível em: < <https://periodicos.ifrs.edu.br/index.php/tear/article/view/2225/1576> >. Acesso: 28 Nov. 2018.
- MACHADO, L. R. S. **Ensino médio e técnico com currículos integrados: propostas de ação didática para uma relação não fantasiosa**. In: JAQUELINE MOLL & Colaboradores. (Org.). Educação profissional e tecnológica no Brasil contemporâneo: Desafios, tensões e possibilidades. 1ª ed. Porto Alegre, RS: ARTMED EDITORA S.A., 2009. Capítulo disponibilizado na Internet. Disponível em: < <http://www.mestradoemgsedl.com.br/wp-content/uploads/2010/06/Ensino-Médio-e-Técnico-com-Currículos-Integrados-propostas-de-ação-didática-para-uma-relação-não-fantasiosa.pdf> >. Acesso: 27 Nov. 2018.
- MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani et al. Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.
- MARINHO, J. C. B.; SILVA, G. R.; SILVA, J. A. Planejamento Cooperativo como método de investigação da sala de aula. **REVISTA ELETRÔNICA DE EDUCAÇÃO**. São Carlos (SP): Universidade Federal de São Carlos. 2015. Disponível em: < <http://www.reveduc.ufscar.br/index.php/reveduc/article/view/968> >. Acesso: 12 Dez. 2018.
- MEC - Ministério da Educação. Catálogo Nacional de cursos Técnicos. Atualizado pela RESOLUÇÃO CNE/CEB Nº 1, DE 5 DE DEZEMBRO DE 2014. 3ª edição. Disponível em: < <http://portal.mec.gov.br/observatorio-da-educacao/30000-uncategorised/52031-catalogo-nacional-de-cursos-tecnicos> >. Acesso: 26 Nov. 2018.
- MEC - Ministério da Educação. Portal da Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica. Expansão da Rede Federal. 2018. Disponível em: < <http://redefederal.mec.gov.br/expansao-da-rede-federal> >. Acesso: 29 Out. 2018.
- MEC - Ministério da Educação. Novo Ensino Médio – DÚVIDAS. 2018. Disponível em: < http://portal.mec.gov.br/component/content/article?id=40361#nem_01 >. Acesso: 26 Nov. 2018.
- MEC. Ministério da Educação. Modelos de Laboratório. 2019. Disponível em: < <http://portal.mec.gov.br/forum-nacional-de-educacao-superior/292-programas-e-aco-es> >

1921564125/brasil-profissionalizado-1679083084/13790-laboratorios >. Acesso: 25 Fev. 2019.

MEIRA, I. A.; *et al.* ENSINO-APRENDIZAGEM ATRAVÉS DE PRÁTICAS LABORATORIAIS DE MICROBIOLOGIA. **Ciência & Tecnologia**: FATEC-JB, Jaboticabal, v. 8, 2016.

Disponível em: < http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/view/659/pdf_1 >.

Acesso: 04 Nov. 2018.

MORESCO, T. R. et al.. Ensino de microbiologia experimental para Educação Básica no contexto da formação continuada. **Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias**. 2017. Disponível em: <

http://reec.uvigo.es/volumenes/volumen16/REEC_16_3_2_ex1156.pdf >. Acesso: 18 nov.

2018.

KRAWCZYK, N. REFLEXÃO SOBRE ALGUNS DESAFIOS DO ENSINO MÉDIO NO BRASIL HOJE. **Caderno de Pesquisa – Fundação Carlos Chagas**. 2011. Disponível em:

< <http://publicacoes.fcc.org.br/ojs/index.php/cp/article/view/70/86> >. Acesso: 26 Nov. 2018.

O GLOBO. Jornal. O GLOBO. Governo exclui 96% dos institutos federais em divulgação do Enem por escola. Reportagem. 2016. Disponível em: <

<https://g1.globo.com/educacao/noticia/governo-exclui-96-dos-institutos-federais-em-divulgacao-do-enem-por-escola.ghtml> >. Acesso: 29 Out. 2018.

PACHECO, E. M. Os Institutos Federais – Uma Revolução na Educação Profissional e Tecnológica. Natal: IFRN, 2010.

PISA - Programa Internacional de Avaliação de Estudantes. Resultados de Ciências – equipe nacional – seminário. 2015. Disponível em: <

<http://portal.inep.gov.br/web/guest/acoes-internacionais/pisa/resultados> >. Acesso: 22 Nov.

2018.

PNE – Plano Nacional da Educação. O Observatório do PNE. 2018. Disponível em: <

<http://www.observatoriodopne.org.br/home/11/22/#a-plataforma> >. Acesso: 15 Nov. 2018.

PNP – Plataforma Nilo Peçanha. Estatísticas Oficiais da Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica. Ano Base 2017. Versão 2 – edição 2018. Disponível em: < <https://www.plataformanilopecanha.org/> >. Acesso: 29 Out. 2018.

POETINI, F. P. **MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS À ATIVIDADES PRÁTICAS PARA O ENSINO DE MICROBIOLOGIA**. Trabalho de Conclusão de Curso e requisito parcial para a obtenção do título de graduado em Ciências da Natureza - Licenciatura. Uruguaiana – 2016. Disponível em: < <http://dspace.unipampa.edu.br/bitstream/riu/1706/1/Filipe-Bastos-Poetini.pdf> >. Acesso: 01 Nov. 2018.

QUADROS, A. L.; MORTIMER, E. F. FORMADORES DE PROFESSORES: ANÁLISE DE ESTRATÉGIA QUE OS TORNAM BEM SUCEDIDOS JUNTO AOS ESTUDANTES. **Revista**

- Investigações em Ensino de Ciências** – V21, 2016. Disponível em: < <https://www.if.ufrgs.br/cref/ojs/index.php/ienci/article/view/16/2> >. Acesso: 12 Dez. 2018.
- RAPOSO, M.; MACIEL, D. A. As Interações Professor-Professor na Co-Construção dos Projetos Pedagógicos na Escola. **Revista Psicologia: Teoria e Pesquisa**. Instituto de Psicologia da Universidade de Brasília. 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/%0D/ptp/v21n3/a07v21n3.pdf> >. Acesso: 25 Nov. 2018.
- REBOUÇAS, M. V.; PINTO, A. C.; ANDRADE, J. B. QUAL É O PERFIL DO PROFISSIONAL DE QUÍMICA QUE ESTÁ SENDO FORMADO? ESSE É O PERFIL DE QUE A SOCIEDADE NECESSITA? **Revista Quim. Nova**, Vol. 28, Suplemento. 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v28s0/26769.pdf> >. Acesso em: 09 Out. 2018.
- ROMEIRO, S. S.; SOUSA, L. F.; OLIVEIRA, L. S. MICROBIOLOGIA: UMA ABORDAGEM ATRAVÉS DE AULAS PRÁTICAS/EXPERIMENTAIS. **I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA) – UNESP**. 2016. Disponível em: < <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/view/657/pdf> >. Acesso: 28 Nov. 2018.
- SAMPAIO, R. L.; ALMEIDA, A. R. S. TEORIA E PRÁTICA NA FORMAÇÃO TÉCNICA: UM ESTUDO DE CASO COM OS EGRESSOS DO INSTITUTO FEDERAL DA BAHIA. *Revista e-Curriculum*, PUC São Paulo, v.11. 2013. Disponível em: < <https://www.redalyc.org/html/766/76628121018/> >. Acesso: 25 Fev. 2019.
- SANDE, D.; SANDE, D. USO DO KAHOOT COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO E ENSINO APRENDIZAGEM NO ENSINO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL. **Revista Holos**. 2018. Disponível em: < <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/6300> >. Acesso: 18 Nov. 2018.
- SANGIONI, L. A.; et al. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia. **Revista Ciência Rural**, 2013. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v43n1/a0313cr4897.pdf> >. Acesso: 18 de Nov. 2018.
- SILVA, E. J. I. A. **O uso do blog no ensino e aprendizagem da microbiologia**. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. Disponível em: < <http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17776> >. Acesso: 18 Nov. 2018.
- SILVA, E. R.; SOUZA, A. S. **Introdução ao Estudo da Microbiologia: Teoria e Prática**. Brasília - DF: Editora do IFB. 67 p. 2013. Disponível em: < <http://revistaixo.ifb.edu.br/index.php/editoraifb/article/view/173/74> >. Acesso: 11 Out. 2018.
- SMANIOTTO, C. L. D. INTERLOCUÇÃO DE SABERES NA PRÁTICA PROFISSIONAL INTEGRADA DE UM CURSO TÉCNICO EM QUÍMICA INTEGRADO AO ENSINO MÉDIO. DISSERTAÇÃO. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. 2015. Disponível em: <

<http://bibliodigital.unijui.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4984/Carmen%20Lourdes%20Didonet%20Smaniotto.pdf?sequence=1> >. Acesso: 15 Out. 2018.

SOARES NETO, J. J.; JESUS, G. R.; KARINO, C. A.; ANDRADE, D. F. UMA ESCALA PARA MEDIR A INFRAESTRUTURA ESCOLAR. *Revista Estudos em Avaliação Escolar*, Fundação Carlos Chagas. Disponível em: <

<http://publicacoes.fcc.org.br/ojs/index.php/eae/article/view/1903/1887> >. Acesso: 21 Fev. 2019.

SODRÉ NETO, L.; MEDEIROS, A. D. CONSIDERAÇÕES SOBRE CONTEXTUALIZAÇÃO E INTERDISCIPLINARIDADE NA ABORDAGEM DA MICROBIOLOGIA NO NOVO EXAME NACIONAL DO ENSINO MÉDIO (ENEM). *Revista Ciências & Ideias*. 2018. Disponível em: < <http://revistascientificas.ifrj.edu.br:8080/revista/index.php/reci/article/view/888> >. Acesso: 28 Nov. 2018.

TODOS PELA EDUCAÇÃO. Anuário Brasileiro da Educação Básica. 2018. Disponível em: < https://todospelaeducacao.org.br/uploads/20180824-Anuario_Educacao_2018_atualizado_WEB.pdf?utm_source=conteudoSite >. Acesso: 25 Nov. 2018.

VEIGA, I. P. A. INOVAÇÕES E PROJETO POLÍTICO-PEDAGÓGICO: UMA RELAÇÃO REGULATÓRIA OU EMANCIPATÓRIA? *Caderno Cedes*. Campinas – SP. 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/ccedes/v23n61/a02v2361> >. Acesso: 25 Nov. 2018.

WATANABE, G.; KAWAMURA, M. R. D. Um Sentido Social para a Divulgação Científica: Perspectivas Educacionais em Visitas a Laboratórios Científicos. ALEXANDRIA: *Revista de Educação em Ciência e Tecnologia*, v.8, n.1. 2015. Disponível em: < <https://periodicos.ufsc.br/index.php/alexandria/article/view/1982-5153.2015v8n1p209/29306> >. Acesso: 12 Dez. 2018.

ZIBAS, D. L. Ser ou não ser: o debate sobre o Ensino Médio. *Caderno de Pesquisa – Fundação Carlos Chagas*. 1992. Disponível em: < <http://publicacoes.fcc.org.br/ojs/index.php/cp/article/view/1003/1012> >. Acesso: 26 Nov. 2018.

ZIBAS, D. L. REFUNDAR O ENSINO MÉDIO? ALGUNS ANTECEDENTES E ATUAIS DESDOBRAMENTOS DAS POLÍTICAS DOS ANOS DE 1990. *Revista Educação e Sociedade*. Campinas – SP. 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/%0D/es/v26n92/v26n92a16.pdf> >. Acesso: 26 Nov. 2018.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – CONTEÚDO DO EMENTÁRIO DA DISCIPLINA MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL (AULA TEÓRICA)

UNIDADE 1 – Microbiologia básica

1.1. Histórico. Reinos microbianos 1.2. Protozoários e algas: características, morfologia, reprodução, ocorrência, classificação, nutrição, ecologia. Principais usos industriais e problemas causados 1.3. Fungos: características, morfologia, reprodução, ocorrência, classificação, nutrição, ecologia. Principais usos industriais e problemas causados 1.4. Bactérias: características, morfologia, reprodução, ocorrência, classificação, nutrição, ecologia. Principais usos industriais e problemas causados 1.5. Vírus: características, morfologia, reprodução, classificação. Principais aplicações e problemas causados

UNIDADE 2 – Elementos de Bioquímica geral e biossíntese de macromoléculas

2.1. Principais macromoléculas bioquímicas: proteínas, enzimas, glicídeos, lipídeos e ácidos nucleicos 2.2. A biossíntese das macromoléculas

UNIDADE 3 – Crescimento microbiano

3.1. Definição. Fatores controladores. Exigências de crescimento 3.2. Formulação de meio de cultura. Cultura pura. Estado físico da cultura 3.3. Medidas de crescimento microbiano 3.4. Curva e equação dos crescimentos descontínuos e contínuos 3.5. Cinética de enzimas. Equação de Michaelis-Menten

UNIDADE 4 – Morte microbiana

4.1. Definição. Mecanismos e agentes de esterilização 4.2. Esterilização de meios de cultura 4.3. Esterilização de equipamentos e vidrarias 4.4. Esterilização de ar

UNIDADE 5 – Importância da Microbiologia Industrial, da Engenharia Bioquímica e da Biotecnologia

5.1. Apresentação de uma indústria de base microbiológica 5.2. Principais produtos de origem microbiológica 5.3. Avanços mais recentes no campo da biotecnologia

UNIDADE 6 – Produção de alguns gêneros alimentícios e fármacos

6.1. Produção de etanol, cerveja, vinhos e vinagre 6.2. Produção de derivados do leite 6.3. Produção de antibióticos 6.4. Produção de hormônios

UNIDADE 7 – Tratamento de efluentes orgânicos com uso de microrganismos

- 7.1. Tratamento aeróbico: lagoas de estabilização, filtros biológicos e lodos ativados
- 7.2. Tratamento anaeróbico de efluentes orgânicos com uso de microrganismos. Biodigestores

ANEXO 2 – CONTEÚDO DO EMENTÁRIO DA DISCIPLINA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL (AULA PRÁTICA)

UNIDADE 1 – Segurança em laboratório

UNIDADE 2 – Microscopia ótica

UNIDADE 3 – Experimentos com células

- 3.1. Compreendendo a osmose
- 3.2. Extração de DNA Vegetal

UNIDADE 4 – Técnicas de esterilização

UNIDADE 5 – Preparo de meios de cultura

UNIDADE 6 – Observação de micro-organismos

- 6.1. Observação de protozoários
- 6.2. Plaqueamento bacteriano e averiguação da presença de micro-organismos no ambiente
- 6.3. Identificação bacteriana e coloração de Gram
- 6.4. Identificação de fungos

UNIDADE 7 – Experimentos com enzimologia

- 7.1. Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos
- 7.2. Um estudo sobre oxidação enzimática
- 7.3. Catalisando a hidrólise da ureia em urina

UNIDADE 8 – Preparo e análise de produtos alimentícios

- 8.1. Preparo de iogurte
- 8.2. Preparo de derivados lácteos
- 8.3. Investigando componentes presentes no leite
- 8.4. Testes de qualidade do leite
- 8.5. Análise qualitativa de proteínas em alimentos com íon cúprico

UNIDADE 9 – Fermentação alcoólica

- 9.1. A química da produção de bebidas alcoólicas

9 APÊNDICES

APÊNDICE 1 – LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS DISPONIBILIZADOS OU NÃO NO LABORATÓRIO, ALÉM DOS CUSTOS CONFORME COTAÇÃO (DEZEMBRO/2018)

SUGESTÃO DE MATERIAIS PARA DISCIPLINA DE LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL						Presente no laboratório? Sim ou não?
Item	Descrição	Quant.	Unidade	Custo unidade	Custo total aprox.	
1	Agar Bacteriológico	1	frasco 500g	696,00	696,00	sim
2	Agar Batata Dextrose	1	pote	350,00	350,00	não
3	Ágar Manitol	1	pote	370,00	370,00	não
4	Ágar nutriente	1	pote	320,00	320,00	não
5	Agitador magnético com aquecimento	2	unidade	1.950,00	3.900,00	sim
6	Água peptonada tamponada	1	frasco 500 g	147,00	147,00	não
7	Alça de Drigalsky	1	saco com 100	72,00	72,00	não
8	Alça microbiológica descartável	1	pacote com 100	27,00	27,00	não
9	Álcool	10	frasco 5 L	60,00	600,00	sim
10	Aparelho de atividade de água	1	unidade		-	não
11	Armários	3	unidade	550,00	1.650,00	sim
12	Autoclave	1	unidade	11.230,00	11.230,00	sim
13	Balança de precisão	2	unidade	6.200,00	12.400,00	não
14	Banho Maria	1	unidade	1.800,00	1.800,00	sim
15	Bastão de vidro	10	unidade	3,00	30,00	sim
16	Béquer (vários volumes)	30	unidade	15,00	450,00	sim
17	Bico de Bunsen + Tela de arame com tripé	5	unidade	104,00	520,00	não
18	Bomba à vácuo	1	unidade	3.920,00	3.920,00	sim
19	Câmara de Macmaster	2	unidade	11,45	22,90	não
20	Câmara de Neubauer	4	unidade	122,00	488,00	não
21	Câmara de Sedgewick Rafter	2	unidade	603,00	1.206,00	não
22	Câmara escura para análise de <i>E. coli</i>	1	unidade	1.550,00	1.550,00	não
23	Capela com luz UV	1	unidade	4.450,00	4.450,00	não
24	Cartela para análise de <i>E. coli</i>	1	caixa com 100	1.350,00	1.350,00	não
25	centrífuga	1	unidade	3.124,00	3.124,00	sim
26	Conjunto de filtração Milipore com garra/base/copo	2	unidade	695,00	1.390,00	não
27	Corante azul de algodão (aula de fungo)	1	frasco 500g	563,00	563,00	não

28	Dessecador	1	unidade	481,00	481,00	sim
29	Destilador 5 L	1	unidade	1.890,00	1.890,00	não
30	Disco para antibiograma	3	vidro	14,00	42,00	não
31	Estufa para vidraria 100 L	1	unidade	3.935,00	3.935,00	sim
32	Estojo metálico para esterilização de pipetas	1	unidade	120,00	120,00	sim
33	Estufa bacteriológica 85 L	1	unidade	2.890,00	2.890,00	sim
34	Estufa DBO	1	unidade	1.500,00	1.500,00	sim
35	Fita de autoclavagem	1	unidade	32,00	32,00	não
36	Frasco de vidro para coleta de amostra de água/esgoto	20	unidade	18,00	360,00	sim
37	Geladeira	2	unidade	1.900,00	3.800,00	sim
38	Isca para agitador Magnético (barra magnética)	3	unidade	23,00	69,00	sim
39	Kit de filtração	2	unidade	890,00	1.780,00	não
40	Kit de Gram	1	unidade	89,00	89,00	sim
41	Kit de prova bioquímica - Kit de Rugai com Lisina	1	caixa	92,00	92,00	não
42	Kit para análise leite (antibiótico, acidez...)	1	unidade	650,00	650,00	não
43	Kit para DQO Hach 21258.25 para 600 mg/L de DQO	1	caixa com 25	650,00	650,00	não
44	Kitazato	2	unidade	149,00	298,00	sim
45	Lactofenol (aula de fungo)	1	unidade	232,00	232,00	não
46	Lâminas	1	caixa com 100	320,00	320,00	sim
47	Lamínulas	1	caixa com 50	12,00	12,00	sim
48	Liquidificador	1	unidade	120,00	120,00	sim
49	Luvas descartáveis	10	unidade	20,00	200,00	sim
50	Meios e reagentes diversos (para cerveja e outros)	10	unidade	10,00	100,00	não
51	Membrana filtrante	1	caixa com 100	596,00	596,00	não
52	Microondas	1	unidade	450,00	450,00	sim
53	Micropipeta 100 a 1000 microlitros	2	unidade	1.000,00	2.000,00	não
54	microscópios	6	individual	4.000,00	24.000,00	não
55	Mufla 997°C	1	unidade	2.120,00	2.120,00	sim
56	Ocular digital para microscópio (lente digital)	2	unidade	1.020,00	2.040,00	não
57	Óleo de imersão	1	unidade	32,00	32,00	sim
58	Pêra de borracha	30	unidade	17,00	510,00	não
59	Pipeta Pasteur	1	saco com 100	122,00	122,00	não
60	Pipetador Pi-pump	5	unidade	18,00	90,00	não
61	Pipetas (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL e 20 mL)	30	unidade	32,00	960,00	sim
62	pissetas para água destilada, álcool 70 e outros	10	unidade	6,00	60,00	sim
63	placas de petri tamanho 90 x 15	30	caixa com 10	30,00	900,00	sim

64	Ponteira	1	saco com 100	200,00	200,00	não
65	Reagentes para DBO	1	vários	1.800,00	1.800,00	não
66	Sachê para análise de <i>E. coli</i>	1	caixa com 200	2.000,00	2.000,00	não
67	Seladora para análise de <i>E. coli</i>	1	unidade	18.500,00	18.500,00	não
68	Silica para dessecador 5000g	1	unidade	357,00	357,00	não
69	swab	1	caixa com 50	999,00	999,00	não
70	Termômetro com haste para leira de compostagem	2	unidade	230,00	460,00	não
71	Teste de Rugai (kit) e Tiras de Oxidase	2	caixas	100,00	200,00	não
72	Tubo de Duhran	1	saco com 100	72,00	72,00	sim
73	Tubo de ensaio com tampa (ver tubo da centrífuga)	100	caixa	5,00	500,00	não
74	Tubo Falcon	8	unidade	42,00	336,00	não
75	Tubos de Eppendorf	1	saco com 100	44,00	44,00	não
76	Verde Malaquita - colorção de Bartolomeu - esporos de <i>Bacillus</i> sp.	1	pote	25,00	25,00	sim
77	Vidrarias em geral (vidro de relógio, Béquer e outros)	200	unidade	20,00	4.000,00	não
78	Vidrarias e equipamentos para análise de DBO	1	vários	16.000,00	16.000,00	não
79	Vortex	2	unidade	1.160,00	2.320,00	não
	TOTAL				153.980,90	

Observações:

- a) Cotações via consulta ao site de 3 empresas renomadas;
b) A indicação "sim" não significa que existe o quantitativo desejado atualmente.

**APÊNDICE 2 – ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA
CONFORME CONTEÚDO DO EMENTÁRIO (VERSÃO DO PROFESSOR)**

**ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS DE
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL NO CURSO TÉCNICO
INTEGRADO DE QUÍMICA – CEFET – *CAMPUS*
TIMÓTEO**

Professor responsável: Flávio Barony

Técnica de Laboratório: Luana Lacerda

Prefácio

“Eis o meu segredo. Ele é muito simples: somente vemos bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos”.

O pequeno texto acima foi extraído da obra “O pequeno príncipe”, de Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944), mas que pode ser imediatamente aplicado à Microbiologia, no sentido de despertá-lo para a essência da vida, ou seja, os constituintes celulares e/ou aqueles seres vivos que não conseguimos visualizá-lo a olho nu, mas assim como os “sentimentos”, sabemos da sua existência e da sua essência para a vida.

Microbiologia é apenas um termo operacional para designar diferentes grupos de seres vivos (bactérias, fungos e outros grupos taxonômicos). Os números são impressionantes, mas apenas à título de exemplo, o corpo humano tem 10 vezes mais bactérias do que células! Estima-se que aproximadamente apenas 10% dos microrganismos existentes no planeta foram identificados, ou seja, há uma enorme lacuna e conhecimento a ser preenchida. Já parou para pensar nisso? Nem todos os microrganismos são seres que causam danos ao homem, aliás, muito pelo contrário, a fração patogênica é bem inferior se comparada aos microrganismos que são essenciais para o Meio Ambiente, os seres vivos em geral, e claro, o homem!

O presente roteiro de aula prática visa desmistificar o “bom” e o “ruim” na microbiologia, mas principalmente cumprir com a ementa estabelecida para a disciplina de “Laboratório de Microbiologia Industrial”, que faz parte da matriz curricular do 1º Ano do Curso Técnico Integrado de Química do CEFET, *campus* Timóteo. Notadamente, os roteiros podem ser contextualizados para atividades em outros cursos Técnicos.

Pressupõe-se que a fundamentação da formação técnica está nas habilidades em operacionalizar os equipamentos do laboratório, com domínio de técnicas de segurança, biossegurança, assepsia e manuseio de material, de forma que a partir da imersão do estudante nas mais diferentes áreas da microbiologia que vier a ocupar (análises clínicas, alimentos, fármacos, biotecnologia e demais áreas) este venha a ter condições de se desenvolver em cada uma dessas especialidades a partir dos elementos aqui apresentados.

Assim, você, estudante do 1º Ano, adolescente e com toda jornada de vida pela frente, deve entender que este roteiro está longe de esgotar o assunto “microbiologia”, mas espera-se que venha a cumprir com a sua formação técnica e humana quando egresso do curso de Química.

Bom trabalho e sucessos!

Timóteo – Janeiro de 2019

SUMÁRIO (seguir a paginação do sumário do corpo do TCC)

UNIDADE 1: SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

1.1 - REGRAS BÁSICAS

1.2 - PRINCIPAIS VIDRARIAS E EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1.3 – MODELO DE RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA

UNIDADE 2: MICROSCÓPIA ÓTICA

2.1 - MICROSCOPIA

2.2 - AULAS EXTRAS DESTA UNIDADE

2.2.1 - Microscópio com o seu celular

2.2.2 - Aplicativos para aulas de Microbiologia

2.2.3 - Coleta de amostras

2.2.4 - Preparação de lâminas

UNIDADE 3: EXPERIMENTO COM CÉLULAS

3.1 – OSMOSE

3.2 - EXTRAÇÃO DO DNA VEGETAL

3.3 – AULA EXTRA: VISUALIZAÇÃO DE FUNGOS DISCUTIDOS EM AULA TEÓRICA

UNIDADE 4: TÉCNICAS DE ESTERELIZAÇÃO

4.1 - TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO

UNIDADE 5: PREPARO DE MEIO DE CULTURA

5.1 - MEIOS DE CULTURA

5.2 – AULA INTEGRADA: ESTERILIZAÇÃO, MEIO DE CULTURA E CÉLULAS 44

5.3 – DILUIÇÃO SERIADA

5.4 - MEIOS DE CULTURA

UNIDADE 6: OBSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

6.1 - OBSERVAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS

6.2 - PLAQUEAMENTO BACTERIANO E AVERIGUAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS

6.3 - IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E COLORAÇÃO GRAM

6.4 - IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

6.5 – REVISÃO GERAL A PARTIR DE NOVAS AULAS

6.5.1 – Antibiograma

6.5.2 – Bioprospecção de fungos

6.5.3 – Teste de Rugai para identificação presuntiva de Enterobactérias

UNIDADE 7: EXPERIMENTOS COM ENZIMOLOGIA

7.1 – ESTUDO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ENZIMAS PRESENTES EM FRUTOS

7.2 – UM ESTUDO SOBRE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA

7.3 – CATALISANDO A HIDRÓLISE DA UREIA EM URINA

UNIDADE 8: PREPARO E ANÁLISE DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

8.1 – PREPARO DE IOGURTE

8.2 – PREPARO DE DERIVADOS LÁCTEOS

8.3 – INVESTIGANDO COMPONENTES PRESENTES NO LEITE

8.4 – TESTES DE QUALIDADE DO LEITE

8.5 – ANÁLISE QUALITATIVA DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS COM ÍON CÚPRICO

UNIDADE 9: FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

9.1 – A QUÍMICA DA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

9.1.1 – Produção de vinho

9.1.2 – Experimento básico e visual sobre fermentação

9.2 – AULAS EXTRAS: A QUÍMICA E A FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E NÃO ALCOÓLICAS

9.2.1 – Cultivo de Leveduras para produção de cerveja

9.2.2 – Bebidas fermentadoras e ação probiótica

APÊNCIDE I – MODELO DE RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA

UNIDADE 1: SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

Objetivos

- * Conhecer as principais normas e riscos inerentes ao da disciplina de Microbiologia Industrial;
- * Conhecer as principais vidrarias e equipamentos.

Duração: 4 aulas

Método

Aula expositiva a partir da demonstração quanto ao uso de EPIs (equipamento de proteção individual) e as principais vidrarias e equipamentos disponíveis.

Visita guiada no laboratório.

Manipulação de vidrarias, em especial, transferência de líquido (água) com o uso da Pera de borracha e pipeta graduada.

1.1 - REGRAS BÁSICAS

A lista abaixo elenca as principais recomendações de segurança no laboratório. São regras gerais, mas que em função da especificidade do laboratório que você vir a utilizar algum dia no seu trabalho ou na continuidade dos seus estudos, exigirá procedimentos específicos. A NR 32 (Norma Regulamentadora) do Ministério do Trabalho e Emprego é uma das que abrange os cuidados em laboratório, mas outras NR's abarcam também os cuidados neste tipo de ambiente.

- 1) Estudantes que apresentem restrição de uso do laboratório em função de “estado de saúde” devem procurar o professor responsável para fins de encaminhamentos junto à coordenação do curso;
- 2) Siga o horário de aula da sua turma (sem trocas de horários);
- 3) Venha para o laboratório portando apenas o material essencial para as aulas;
- 4) Siga estritamente o roteiro das aulas e sempre faça os “relatórios de aula prática”;
- 5) O laboratório é de uso exclusivo para as atividades de Microbiologia, sendo vedado o uso de outros materiais, salvo sob orientação do professor ou técnico de laboratório;

- 6) É proibido o uso de aparelhos de som, fone de ouvidos e outros que venham a perturbar o ambiente de aula;
- 7) Será permitido o uso do celular em alguns casos específicos, como para retirar fotos de etapas da atividade prática. Não deixe o celular sobre a bancada e o mantenha sempre junto aos seus objetos;
- 8) É proibida a ingestão de alimentos e medicamentos dentro do laboratório;
- 9) O uso de jalecos é obrigatório durante as aulas;
- 10) Jamais fume na área do laboratório (risco de explosão e outros);
- 11) É proibida a manipulação de lentes de contato no laboratório;
- 12) É vedado o uso de pulseiras, adornos, roupas folgadas, cabelo longo e solto, bonés e outras vestimentas que possam colocar em risco o estudante e/ou pessoas próximas;
- 13) Utilize os EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) ou EPC (Equipamento de Proteção Coletiva) conforme recomendação;
- 14) Certifique da voltagem dos equipamentos antes de liga-los aos interruptores de energia (pode vir a danificar o equipamento);
- 15) Certifique que ao final da aula os equipamentos estão em condições de guardá-los ou de mantê-los ligados, quando for o caso;
- 16) Mantenha o ambiente limpo e organizado, e se não for possível lavar o material a ser utilizado, ao menos deixe-o próximo à pia;
- 17) Não cheire e nem toque em nenhum material existente no laboratório (riscos de queimaduras e outros acidentes);
- 18) Nunca pipetar líquido com a boca;
- 19) Mantenha o material de uso devidamente identificado, principalmente os meios de cultura e outros reagentes;
- 20) Não retire material do laboratório sem autorização do responsável;
- 21) Sempre limpe a bancada com "álcool 70" antes e ao final da atividade microbiológica;

- 22) Fazer o correto descarte do material autoclavado, nunca o deixando sobre as bancadas, piso ou demais locais inapropriados;
- 23) Não toque nas maçanetas das portas, puxadores de gavetas e outros pontos de uso coletivo com luvas contaminadas (risco de transmissão de doenças parasitárias);
- 24) Relatar ao docente ou técnico de laboratório qualquer anormalidade, como derramamento de meio de cultura;
- 25) Jamais utilize a geladeira ou outros compartimentos para guardar alimentos para consumo humano;
- 26) Jamais utilize vidrarias com avarias em sua superfície (trincas, por exemplo);
- 27) Em caso de limpeza de vidrarias, tenha cuidado para não se cortar durante a limpeza com água e sabão;
- 28) Deixar o material contaminado (lâminas, pipetas) após o uso em recipientes contendo desinfetantes;
- 29) Equipamentos que utilizam calor, pressão ou gás devem ter OPERAÇÃO ASSISTIDA durante todo o procedimento, sem JAMAIS desviar a sua atenção para outras atividades em paralelo;
- 30) Colocar vidrarias aquecidas sobre meios isolantes (pano, por exemplo), e não diretamente sobre a bancada ou superfícies frias, sob o risco de vir a trincar ou quebrar;
- 31) Em caso de mal estar, dirija-se ao ambiente externo, desde que previamente acompanhado e sob a orientação do docente ou técnico responsável;
- 32) Mantenha comportamento condizente com o ambiente de laboratório, sem agitação, correria e outros desta natureza;
- 33) O professor ou técnico responsável tem autonomia para solicitar a saída do estudante que vir a burlar os procedimentos de segurança;
- 34) Em caso de acidente (corte, queimaduras, tontura e outros), fique calmo e procure ajuda imediatamente, via professor ou técnico do laboratório.

LEMBRE-SE: laboratório de microbiologia é um ambiente que requer “limpeza”!

1.2 - PRINCIPAIS VIDRARIAS E EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA


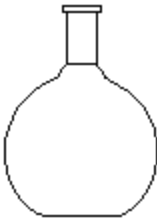
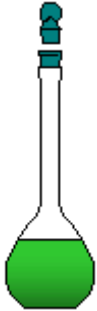

O termo “vidraria” é uma denominação genérica para boa parte dos equipamentos utilizados em laboratório, mas que nem sempre são de vidro, podendo ser também de porcelana, por exemplo.


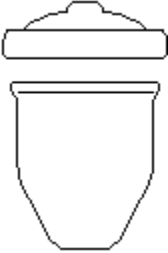

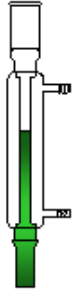
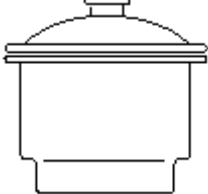
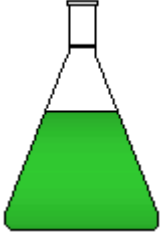
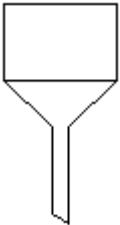
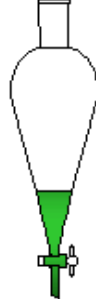
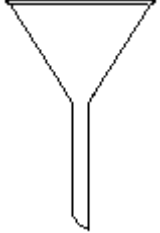
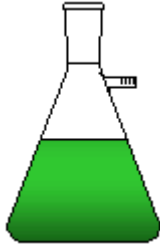
A grande vantagem de se utilizar o vidro em laboratório e a capacidade de resistir ao frio e calor extremos. Ademais, por ser transparente e inerte, facilitam a observação do material em estudo e apresenta baixa probabilidade de reagir a produtos químicos, respectivamente (PROLAB, 2014).








O laboratório de Microbiologia utiliza a maior parte das vidrarias e equipamentos que comumente se utiliza no laboratório de Química, solos ou outro, mas com o viés indispensável da assepsia (higienização dos equipamentos).

O quadro 1 abaixo apresenta algumas vidrarias e equipamentos comumente utilizados em um laboratório de Microbiologia.

Quadro 1 – Principais vidrarias e equipamentos do laboratório de Microbiologia

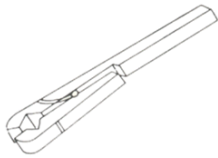


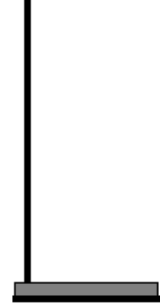
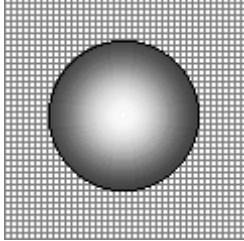




Vidraria	Finalidade	Vidraria	Finalidade
	Almofariz com pistilo: Usado na trituração e pulverização de sólidos		Balão de fundo chato: Utilizado como recipiente para conter líquidos ou soluções, ou mesmo, fazer reações com desprendimento de gases.
	Balão volumétrico: Possui volume definido e é utilizado para o preparo de soluções em laboratório		BECKER: É de uso geral em laboratório. Serve para fazer reações entre soluções, dissolver substâncias sólidas, efetuar reações de precipitação e aquecer líquidos.

	<p>Bureta: instrumento utilizado em titulações para medidas precisas de líquidos. A bureta é ideal para análises volumétricas porque possui graduação em seu comprimento para facilitar a leitura de volume escoado.</p>		<p>Cadinho: Peça geralmente de porcelana cuja utilidade é aquecer substâncias a seco e com grande intensidade, por isto pode ser levado diretamente ao <u>Bico de Bunsen</u>.</p>
	<p>Cápsula de Porcelana: Peça de porcelana usada para evaporar líquidos das soluções</p>		<p>Condensador: Utilizado na destilação, tem como finalidade condensar vapores gerados pelo aquecimento de líquidos</p>
	<p>Dessecador: Usado para guardar substâncias em atmosfera com baixo índice de umidade</p>		<p>Erlenmeyer: Utilizado em titulações, aquecimento de líquidos e para dissolver substâncias e proceder reações entre soluções</p>
	<p>Funil de Buchner: Utilizado em filtrações a vácuo. Pode ser usado com a função de FILTRO em conjunto com o <u>Kitassato</u>.</p>		<p>Funil de separação: Utilizado na separação de líquidos não miscíveis e na extração líquido/líquido</p>
	<p>Funil de haste longa: Usado na filtração e para retenção de partículas sólidas. Não deve ser aquecido.</p>		<p>KITASSATO: Utilizado em conjunto com o FUNIL DE BUCHNER em FILTRAÇÕES a vácuo</p>

	<p>Pipeta graduada: Utilizada para medir pequenos volumes. Mede volumes variáveis. Não pode ser aquecida</p>		<p>Pipeta volumétrica: Usada para medir e transferir volume de líquidos. Não pode ser aquecida, pois possui grande precisão de medida.</p>
	<p>Proveta ou cilindro graduado: Serve para medir e transferir volumes de líquidos. Não pode ser aquecida</p>		<p>Tubo de ensaio: Empregado para fazer reações em pequena escala, principalmente em testes de reação em geral. Pode ser aquecido com movimentos circulares e com cuidado diretamente sob a chama do <u>Bico de Bunsen</u>.</p>
	<p>Vidro de relógio: Peça de Vidro de forma côncava usada em análises e evaporações. Não pode ser aquecida diretamente</p>		
OUTROS EQUIPAMENTOS DE INTERESSE			
Equipamento	Finalidade	Equipamento	Finalidade
	<p>Anel ou argola: Usado como suporte do funil na filtração</p>		<p>Autoclave: Utilizado para esterilização de produtos, tanto material “limpo” a ser utilizado, mas como também material a ser descartado (antes de envio para o lixo “comum”).</p>

	<p>Analisador de Atividade de Água: Utilizado para prevenção da proliferação microbiana, oxidação e demais reações não desejáveis, garantindo qualidade e vida de prateleira de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos.</p>		<p>Alça microbiológica: utilizada para inoculação de microrganismos em meios de cultura e rotinas de bacteriologia em geral.</p> <p><u>Ver também: Alça de Flambagem e Alça Drigalski</u></p>
	<p>Agitador Magnético: utilizado para mistura de líquidos ou amostras. Utiliza uma "isca" para agitação. Alguns veem com chapa aquecedora</p>		<p>Banho Maria: Utilizado em laboratórios para aquecer substâncias líquidas e sólidas que não podem ser expostas diretamente no fogo e que precisam ser aquecidas lenta e uniformemente.</p>
	<p>Balança digital: Para a medida de massa de sólidos e líquidos não voláteis com grande precisão</p>		<p>Bico de Bunsen: É a fonte de aquecimento mais utilizada em laboratório. Mas contemporaneamente tem sido substituído pelas <u>mantas e chapas de aquecimento</u></p>
	<p>Capela: Ideal para eliminar vapores tóxicos e odores durante a manipulação de reagentes em laboratórios</p>		<p>Estante para tubo de ensaio: É usada para suporte de os <u>tubos de ensaio.</u></p>
	<p>Estufa de esterilização: utilizada para secar material.</p>		<p>Estufa bacteriológica: utilizada para cultivo e preparo de reagentes, normalmente com temperatura constante (36°C).</p>
	<p>Forno micro-ondas: Utilizado com meio alternativo ao aquecimento (avaliar se haverá danos à amostra em estudo)</p>		<p>Geladeira: conservação de reagentes ou meios de cultura que requerem temperatura baixa e sob controle uniforme.</p>

	<p>Garra do Condensador: Usada para prender o condensador à haste do suporte ou outras peças como balões, erlenmeyers e outros.</p>		<p>Lamínula: proteger a objetiva do microscópio do material da lâmina.</p> <p>Lâmina: acondiciona o material a ser examinado no microscópio.</p>
	<p>Microscópio: utilizado para ampliar a imagem dos microrganismos sob identificação.</p>		<p>Óleo de imersão: permitir melhor resolução da imagem do microscópio quando se utiliza a “objetiva de 100”. O óleo minimiza a dispersão da luz</p>
	<p>Membrana filtrante: filtração de amostras de pequeno porte (porosidade de 0,45 µm).</p>		<p>Mufla: Forno Mufla é utilizado em laboratórios para o processo de calcinação. Pode chegar a 1000°C.</p>
	<p>Pera de borracha ou Pipetador de 3 vias: Também chamadas de pipetadores por três vias, as pêras de sucção são utilizadas para auxiliar na sucção de líquidos em pipetas.</p>		<p>Pipeta automática: utilizado para medição e transferência de pequenos volumes líquidos. É um instrumento que utiliza ponteiros descartáveis.</p>
	<p>Pipetador Pi-pump: faz a sucção do líquido ou transferência por meio de uma roldana, o que facilita o manuseio</p>		
	<p>Pipeta Pasteur: é usada para transferência de líquidos em geral através de aspiração e dispensação feita através do bulbo para sucção. Geralmente feita de plástico, ela não possui precisão como outros tipos de pipeta</p>		<p>Placa de Petri: recipiente estéril, constituído por uma base e tampa, ideal para crescimento da amostra em condições controladas.</p>

	<p>Pinça de madeira: Usada para prender o <u>tubo de ensaio</u> durante o aquecimento</p>		<p>Pinça metálica: Usada para manipular objetos aquecidos</p>
	<p>Pisseta ou frasco lavador: Usada para lavagens de materiais ou recipientes através de jatos de água, álcool ou outros solventes</p>		<p>Suporte universal: Utilizado em operações como: Filtração, Suporte para Condensador, Bureta, Sistemas de Destilação etc. Serve também para sustentar peças em geral</p>
	<p>Tela de amianto: Suporte para as peças a serem aquecidas. A função do amianto é distribuir uniformemente o calor recebido pelo <u>bico de bunsen</u></p>		<p>Tripé: Sustentáculo para efetuar aquecimentos de soluções em vidrarias diversas de laboratório. É utilizado em conjunto com a <u>tela de amianto</u></p>
	<p>Vidro Cristal: vidro de alta qualidade e transparência, geralmente denominado vidro boro que possui maior resistência a choques térmicos, mecânicos e químicos</p>		<p>Vidro âmbar: é o vidro escurecido, utilizado na maioria das vezes para diminuir o efeito da luz no armazenamento de compostos fotossensíveis</p>
	<p>Vortex: utilizado para a agitação e homogeneização de líquidos contidos em pequenos tubos ou frascos</p>		

ALGUNS CONCEITOS E REAGENTES DE INTERESSE

<p>Água deionizada: A deionização (ou desmineralização) é um processo de remoção de íons (cátions/ânions) através de um</p>	<p>Água Destilada: não contém elementos orgânicos. A parte inorgânica fica no resíduo da destilação. Assim, a água destilada quase</p>	<p>Ágar Bacteriológico: é um ágar purificado no qual impurezas, pigmentos e sais foram removidos ou reduzidos ao mínimo. É um extrato</p>	<p>Ágar: substância em gel colocada na placa de Petri que suporta e propicia o crescimento dos microrganismos.</p>
--	---	--	---

sistema de resinas trocadoras de íons.	sempre é pura. A água destilada é estéril enquanto estiver protegida do ar ambiente.	hidrossolúvel extraído de algas vermelhas e pode ser utilizado como agente solidificante em meio de cultura bacteriológico ou para determinar motilidade e crescimento de anaeróbios e microaerófilos.	
Inóculo: quando os microrganismos de interesse são colocados em um meio de cultura para iniciar o crescimento	Meio de cultura: base que oferece nutrientes, favorecendo o crescimento de determinado microrganismo.	Cultura: quando microrganismos crescem e se multiplicam no meio.	Incubação: processo de laboratório, por meio do qual se cultivam microrganismos com o fim de estudar ou facilitar o seu desenvolvimento.

Fonte: Adaptado de Salvatori *et al.*, (2013) e UNESP (2013)

1.3 – MODELO DE RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA

Todas as aulas práticas deverão ser acompanhadas do respectivo relatório. O modelo de relatório é apresentado no **Apêndice I**. Abaixo é apresentada a estrutura do relatório. O mesmo deve ser entregue preferencialmente ao final de cada aula.

1 – Título: Aborda o número da aula e o assunto abordado. Ex: Aula 4 – O uso do Microscópio.

2 – Introdução: Um breve parágrafo sobre a contextualização do assunto da aula. São as informações mais relevantes sobre o assunto abordado.

3 – Objetivos: Descrever o objetivo da aula, podendo existir “um” objetivo geral e outros objetivos específicos.

4 – Material e Métodos: Relacionar os materiais utilizados e em linhas gerais o passo a passo da prática.

5 – Resultados: apresentar os números finais da aula ou informações gerais extraídas. Pode utilizar ilustrações (desenhos e gráficos manuscritos) e até fotografias da aula (caso disponha de tempo para impressão). Deve relatar a interpretação dos resultados.

6 – Conclusão: deve ser diretamente ligado ao objetivo, ou seja, se foi alcançado ou não.

7 – Bibliografia: Citar a bibliografia utilizada.

Exercícios

1) Por que se utiliza o vidro no laboratório em detrimento de outros materiais, mesmo sabendo-se dos riscos relacionados a quebras e/ou acidentes com este tipo de material?

2) Quais os cuidados para preservar a durabilidade das peras de borracha?

3) Qual a importância prática do conhecimento das vidrarias no dia a dia do laboratório?

4) Um estudante pretender preparar uma solução de 300 mL de água com 10g de açúcar. Qual a melhor vidraria a ser utilizada para esta preparação? Justifique.

5) Quais são os principais riscos relacionados no laboratório do *campus* e quais medidas devem ser adotadas para preveni-los?

6) Manuseio:

a) Faça a transferência de 1 mL (água) do Béquer para 5 tubos de ensaio com o uso da Pera de Borracha e Pipeta.

b) Coloque a lamínula sobre a lâmina com o uso da pinça (faça a flambagem em chama).

c) Use o pipetador para fazer a transferência indicada na letra “a”.

Referências

SALVATORI, R. U. **Laboratório de Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e procedimentos operacionais padrões.** Org. Rosângela Uhrig Salvatori, Greice Aline Kaisekamp Wolf, Fabíola Dresch e Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen - Lajeado: Ed. da Univates, 2013. 72 p.

UNESP. Universidade Estadual Paulista. **Guia para utilização de laboratórios químicos e biológicos.** Elaborado por: Sandra Mara Vieira de Camargo Gavetti.

2013. Disponível em: <

https://www.sorocaba.unesp.br/Home/CIPA/Treinamento_para_utilizacao_de_laboratorios_quimicos_e_biologicos_leitura.pdf >. Acesso: 13 de Fev. 2019.

UNIDADE 2: MICROSCÓPIA ÓTICA

Objetivos:

- * Conhecer os tipos de microscópicos;
- * Conhecer os componentes do microscópio óptico;
- * Visualizar lâminas temporárias e permanentes

Duração: 4 aulas

Método

Aula expositiva.

Manuseio das lâminas e visualização ao microscópio.

2.1 - MICROSCOPIA

Uma grande ansiedade das aulas de microbiologia é a possibilidade de visualização das imagens microscópicas. O olho humano tem poder de resolução na faixa de 0,1 a 0,2 mm.

A microscopia óptica (MO) refere-se ao uso de qualquer tipo de microscópio que utilize luz para observar amostras. Ele aumenta as imagens através da luz, que após incidir sobre a amostra, passa pelas lentes objetivas (que formam e aumentam a imagem) e oculares (que aumentam a imagem).

O Poder de resolução é a capacidade de distinguir dois pontos muito próximos um do outro, sendo que os microscópios ópticos têm um limite de resolução da ordem de 0,2 μm . Isso significa que dois pontos separados por uma distância de pelo menos 0,2 μm são visualizados. Todavia, faz-se necessária que a amostra seja suficientemente fina para que os raios luminosos a atravessem, bem como índices de refração ou coloração diferentes do meio que a circundam.

O índice de refração é a medida de capacidade de curvatura da luz em um meio. O índice de refração é alterado por coloração (conteúdo de outras unidades da disciplina).

Para preservar a direção da luz na maior ampliação utiliza-se o óleo de imersão, pois possui o mesmo índice de refração que o vidro.

Informações importantes

- a) Microscópio óptico apresenta ampliação de 60 a 1000 x (ondas luminosas)
- b) Microscópio eletrônico de varredura: 20 a 100.000 x;

- c) Microscópio eletrônico de transmissão (feixe de elétrons): 1000 a 500.000 x;
- d) Unidade de medida mais adotada no microscópio: é o Micrômetro (μm), que é 10^{-3} mm;
- e) Menor objeto visto com perfeição ao microscópio de luz: $0,2\mu\text{m}$, sendo que $0,2\mu\text{m} \times 1000 = 0,2\text{mm}$.

Partes do microscópio óptico típico

- 1) Base: é o suporte do microscópio, peça que sustenta todas as outras.
- 2) Braço ou estativa: é a peça que liga a base até a parte superior do microscópio e onde se deve segurar o microscópio para ser transportado.
- 3) Fonte de luz ou Iluminador: normalmente uma lâmpada ou, em modelos mais antigos, um espelho, que se apoia na base do microscópio. No caso da fonte de luz ser uma lâmpada, pode-se observar, ao lado da estativa ou da base do microscópio, o interruptor da lâmpada e o regulador da intensidade luminosa.
- 4) Lente condensadora (Condensador): de forma circular e situado entre a platina e a base, o condensador converge os raios luminosos provindos da lâmpada e projeta-os como um cone de luz sobre o material que está sendo examinado.
- 5) Diafragma (Filtro de luz): fica abaixo da lente condensadora e se liga a uma alavanca que permite sua abertura ou fechamento, levando ao controle da passagem total ou parcial da luz.
- 6) Platina: é uma placa de metal com um orifício no centro, por onde passam os raios luminosos. O objeto que vai ser observado é colocado sobre uma lâmina de vidro e esta, sobre a platina, exatamente em cima do orifício.
- 7) Charriot: Localizado acessória e superficialmente à platina, é formado por uma presilha, dois botões giratórios e dois trilhos que têm a função de movimentar a lâmina no plano e assim permitir a observação de toda a sua área.
- 8) Lentes objetivas: são lentes que projetam uma imagem aumentada e invertida do objeto nas oculares e inserem-se no revólver, através de rosca. Toda objetiva traz gravado o número do aumento que proporciona. A objetiva de 100X é também chamada objetiva de imersão e é somente utilizada com óleo especial, o qual permite maior refração da luz para dentro da objetiva, corrigindo a pouca luminosidade nas observações feitas em grandes aumentos. Após o uso, o óleo é removido com xilol, éter ou benzina, embebido em papel especial ou algodão.

9) Revólver: peça encontrada abaixo do canhão na qual se inserem as lentes objetivas. É dotado de um movimento de rotação que permite posicionar a objetiva desejada para a observação do material a ser analisado.

10) Canhão: parte mais superior do microscópio, contém um conjunto de espelhos que projetam a imagem em direção às oculares nele encaixadas.

11) Lente ocular: aumenta a imagem do objeto após o aumento já proporcionado pela objetiva. É através desta lente que o observador vê a imagem do objeto (daí o nome ocular, uma vez que o olho do observador está colocado à frente dela). Toda ocular traz gravado o número de aumentos que proporciona. Para saber-se em que aumento vemos um objeto ao microscópio, basta multiplicar o número do aumento dado pela objetiva pelo número do aumento dado pela ocular. Por exemplo, se a objetiva usada aumenta 5X e a ocular aumenta 10X, o objeto está sendo observado com um aumento total de 50X.

12) Macrométrico e micrométrico (ajuste grosso e fino, respectivamente): na parte lateral da estativa existem 2 parafusos encaixados um no outro. O maior deles é o macrométrico, que permite grandes avanços ou recuos da platina em direção à objetiva, enquanto o micrométrico permite pequenos avanços ou recuos. Esse movimento da platina leva à focalização do material observado em diferentes aumentos.

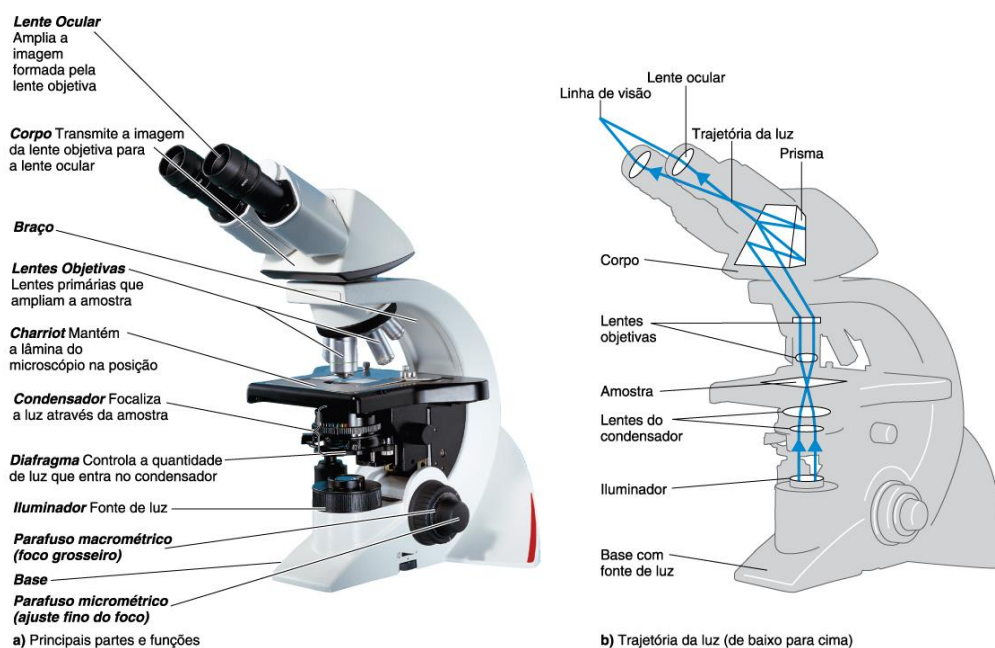


Figura 1 – Partes do Microscópio Óptico
Fonte: Tortora *et al.*, 2012.

Observação da amostra

Siga as normas de uso do microscópio descritas a seguir para proceder à observação nos aumentos de 4X, 10X, 40X e 100X. Observe na figura a seguir a distância entre lâmina e objetivas durante a observação (figura 2):

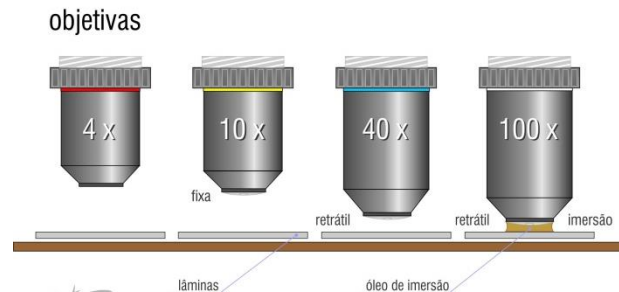


Figura 2 – Distância entre a Lente Objetiva e a lâmina. Fonte: IFSC, 2017.

- 1) Coloque a lâmina sobre a platina, segurando-a com uma das mãos e abrindo a presilha com a outra. Procure colocar a amostra o mais centralizado possível em relação ao feixe de luz;
- 2) Gire o revólver, encaixando a objetiva de menor aumento (4X ou 10X). Sempre use da menor para a maior;
- 3) Acenda a luz do microscópio (acione primeiramente o interruptor e em seguida o regulador de intensidade) e centralize o material na platina utilizando o charriot. Faça isso olhando lateralmente, o que facilita a operação.
- 4) Movimentando o macrométrico, levante a platina até o ponto máximo, sem que a lâmina encoste na objetiva.
- 5) Ajuste a distância interpupilar.
- 6) Olhe através das oculares e, utilizando o macrométrico, desça lentamente a platina até que se possa visualizar o material a ser analisado.
- 7) Acerte o ponto exato do foco com o micrométrico e, caso seja necessário, proceda ao ajuste de dioptria: tape um dos olhos, focalize com o micrométrico, troque o olho tapado e ajuste o foco no anel existente (se houver) na base da ocular correspondente ao olho aberto.
- 8) Corrija a intensidade de luz e abertura do diafragma para evitar ofuscamento e permitir a percepção de profundidade de campo e o contraste desejados.
- 9) Observe o material atentamente trabalhando o foco fino com o micrométrico.

- 10) Gire o revólver para passar para a próxima objetiva de maior aumento, lembrando sempre de regular a intensidade de luz e a abertura do diafragma, bem como de corrigir a focalização com o micrométrico. Não utilizar o macrométrico para a focalização a partir desta etapa. Somente o micrométrico.
- 11) Realize a observação nas objetivas de 10X e 40X.
- 12) Para utilizar a objetiva de 100X é imprescindível o uso do óleo de imersão sobre a lâmina: gire o revólver de modo a deixar a lâmina entre as objetivas de 40X e 100X.
- 13) Encoste o conta-gotas contendo o óleo de imersão na lâmina, exatamente sobre a amostra. Não é necessário apertar o bulbo do conta gotas. Uma pequena gota de óleo é suficiente para a observação.
- 14) Atentamente, gire o revólver para encaixar a objetiva de 100X e ajuste o foco com o micrométrico. Uma vez utilizado o óleo de imersão na objetiva de 100X, jamais retorne para as outras objetivas (que não necessitam de óleo), pois o óleo suja as lentes e interfere na visualização.
- 15) Após a visualização na objetiva de 100X, o óleo de imersão deve ser removido da objetiva logo após o uso com um pedaço de algodão embebido em solução de limpeza (éter/etanol).
- 16) Anote qual é a abertura numérica (AN) de cada lente objetiva.
- 17) Terminada a observação, encaixe a objetiva de menor aumento, abaixe totalmente a platina, deixe a intensidade de luz no mínimo e desligue-a, retire a lâmina, limpe o microscópio, cubra-o com a capa e guarde-o.
- 18) Como conduta de boas práticas de laboratório, guarde todo o material utilizado durante a aula e limpe a bancada com álcool 70%, deixando-a limpa.

Caracterização das lentes objetivas



Figura 3: Informações básicas nas lentes objetivas. Fonte: IFSC, 2017.

Para realização de cálculos:

Ampliação total = ampliação da ocular x ampliação da objetiva.

Limite de resolução (LR) = $k \times \lambda / AN$, onde:

$k = 0,61$ (constante)

$\lambda = 0,55$ (em μm , é o comprimento de onda que corresponde à radiação na banda do amarelo-verde e para a qual o olho humano apresenta maior sensibilidade).

Exercícios

1) Preencha a tabela.

Microscópio (Marca e modelo, se disponíveis)				
Ampliação da ocular				
Ampliação das objetivas	4x	10x	40x	100x
Ampliação total				
Abertura numérica				
Limite de resolução				

2) Faça a visualização da lâmina entregue pelo professor utilizando todas as objetivas, mas em apenas 2 minutos.

3) Faça o desenho da estrutura visualizada.

Referências

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al.. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo. Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares Microbiologia. Guia disponível na internet. 2017.

Disponível em: <

<http://biologia.ifsc.usp.br/micro/roteiro/roteiro01.pdf> >. Acesso: 19 Jan. 2018.

USP – Universidade de São Paulo. Site. Disponível em: <

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2845663/mod_resource/content/2/Pratica2.pdf >. Acesso: 13 Fev. 2019.

2.2 - AULAS EXTRAS DESTA UNIDADE

As aulas extras visam oferecer o conteúdo complementar, que pode ser utilizado ao longo do ano, como por exemplo, em alguma Mostra Acadêmica.

2.2.1 - Microscópio com o seu celular

Inúmeros vídeos disponíveis na Internet ensinam a fazer um “microscópio caseiro” a partir do seu smartphone. Embora com limitações para visualização a nível celular, estruturas do tecido vegetal e de pequenos animais podem ser observadas com maior nitidez para estudos, pois a imagem pode ser ampliada em mais de 100 vezes.

Faça você mesmo e experimente outras opções também!

Materiais

3 parafusos de 4 ½” x 5/16”

9 porcas de 5/16”

2 porcas de orelhas de 5/16” (porca “borboleta”)

5 arruelas de 5/16”

1 plataforma de madeira para a base de 2 cm x 18 cm x 18 cm

1 plataforma de acrílico para o celular de 0,3 cm x 18 cm x 18 cm

1 plataforma de acrílico para os objetos de 0,3 cm x 7,6 cm x 18 cm

1 Lente de laser de caneta (ou duas lentes, se quiser aumentar a ampliação)

Lanterna ou LED (necessário para visualizar amostras de contraluz)

Ferramentas

Broca para perfurar e Régua

Referências

<http://revistagalileu.globo.com/Tecnologia/Inovacao/noticia/2014/10/aprenda-como-transformar-seu-smartphone-em-um-microscopio-caseiro.html>

2.2.2 - Aplicativos para aulas de Microbiologia

A internet oferece uma série de ferramentas que podem aprofundar o conhecimento. Entre elas, tem o MOL – Microscopia Online – produzido pela USP – Universidade de São Paulo. São visualizações de histologia.

Link: <http://mol.icb.usp.br/>

Há também aplicativos disponíveis para o celular. Alguns estão listados abaixo:

Guia de parasitologia (versão com custos):

<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.tadeurocha.appparasito&hl=pt-br>

Células procariontes (Unicamp):

https://www2.ib.unicamp.br/lte/bdc_uploads/materiais/versaoOnline/versaoOnline805_pt/S_2_1_9_Lam_cel_proc/Microscopio.swf

Bacteriologia

<https://play.google.com/store/apps/details?id=BacteriologiaFree.Doctor>

Microbiologia

https://play.google.com/store/apps/details?id=com.andromo.dev474745.app459179&hl=pt_BR

2.2.3 - Coleta de amostras

Uma importante etapa no dia a dia do laboratório é a preparação de amostras para análises. Obviamente que em função do que se está analisando, há uma série de peculiaridades. Elencamos algumas regras básicas para você seguir, sendo:

- Procure fazer amostras em duplicata, principalmente em experimentos científicos;
- Sempre utilize material autoclavado para fins de manuseio da amostra, pois caso contrário poderá indicar “falso resultado”;
- Não deixar objetos pessoais sobre a bancada e higienizar a bancada com Álcool 70 antes e ao fim das atividades;
- Proceder a manipulação de vidrarias e materiais diversos próximo a chama ou na capela (uso do exaustor e raio UV, quando couber);
- O USO DE LUVAS ESTÉREIS DURANTE A ATIVIDADE É INDISPENSÁVEL, bem como outros mais quando necessário (óculos de segurança, máscara facial, calçados fechados e jaleco).

Referências

ANA – Agência Nacional das Águas. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos.**

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus

Brandão *et al.*. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. 326p. Disponível em: <

<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf> >. Acesso: 17 Jan. 2018.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica. Módulo III.** 45 p. Disponível em: <

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_3_2004.pdf >.

Acesso: 17 Jan. 2018.

2.2.4 - Preparação de lâminas

A preparação de lâminas microscópicas visa a melhor identificação das estruturas quando sob investigação/visualização. Existem 2 tipos de lâminas: 1) lâminas preparadas à fresco; 2) lâminas permanentes. Neste primeiro momento daremos ênfase a lâminas à fresco, que fundamenta-se na observação de **microrganismos vivos** (bactérias, protozoários, fungos e leveduras) em suspensão do material biológico entre lâminas e lamínulas, onde se pode observar as formas e os movimentos dos mesmos. A seguir são apresentadas duas preparações de lâminas.

a) Preparação de lâminas para primeira aula de microscopia

- 1) Cortar um pedaço de jornal de aproximadamente 1 cm;
- 2) Limpar bem uma lâmina e, com um conta-gotas pingar, sobre ela, uma gota de água;
- 3) Sobre a gota colocar o pedaço de jornal e esperar alguns segundos;
- 4) Sobre o jornal colocar uma lamínula limpa;
- 5) Se houver bolhas de ar pressionar levemente a lamínula com uma pinça;
- 6) Levar a lâmina preparada ao microscópio;
- 7) Iniciar a observação em menor aumento.

b) Preparação de lâminas em geral. OBS.: Outras preparações e com mais detalhes técnicos ocorrerão nas aulas seguintes e nos próximos bimestres.

A preparação de lâminas nem sempre é uma atividade simples, todavia, é possível alcançar bons resultados para observar diversas estruturas, como cloroplastos em células de (planta de aquário). Neste roteiro, o foco será a preparação microbiológica. Assim, tem-se como sugestões:

1) Células da boca:

- a. Raspe levemente o interior da boca com um cotonete;
- b. Passe o material coletado sobre uma lâmina (25 * 75mm);
- c. Coloque uma gota de corante azul de metileno;
- d. Cubra o material com a lamínula.

2) Observação do micélio do fungo:

- a. Colocar uma gota de água (ou corante) na lâmina (25 * 75mm);
- b. Pegar parte do micélio com alça de repicagem ou fita colante (durex);
- c. Colocar o micélio sobre a lâmina;
- d. Colocar a lamínula (não usar lamínula quando usar durex);
- e. Observar nos aumentos de 40x e 100x (400x se for necessário).

Lembre-se de que, para observar uma estrutura no microscópio, deve haver passagem do feixe de luz. Assim sendo, materiais muito grossos são impossíveis de serem visualizados, sendo necessária a realização de cortes.

Referências

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14^aed. 1006 p. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10^a ed, 2012. 934p.

UNIDADE 3: EXPERIMENTO COM CÉLULAS

3.1 – OSMOSE

Objetivos

- * Conhecer os processos de difusão e as principais características;
- * Desenvolver algumas atividades práticas e observar o efeito osmótico;
- * Conceituar os tipos de osmose e as possíveis aplicações na indústria.

Duração: 4 aulas

Breve conceituação sobre Osmose

A membrana controla a atividade na periferia celular, ou seja, controla o fluxo de moléculas e íons, além das reações químicas que produzirão o metabolismo. Logo, as células vivas mantêm gradientes de concentração do meio intracelular e extracelular por meio de suas membranas. Assim, gradientes diferentes ocorrem para proteínas, K, Na e Cl, por exemplo.

Muitas das proteínas da membrana são enzimas e estas funcionam como receptores para as mensagens químicas vindas de outra célula ou do meio externo.

A membrana atua na atividade celular em: Compartimentalização, base para atividade biológica, barreira seletiva, transporte, resposta a sinais externos, interações entre células e energia.

A membrana é um mosaico fluído de fosfolipídeos e proteínas, sendo que as moléculas de fosfolipídio formam a bicamada. Colesterol e proteínas estão inseridos na camada fosfolipídica.

Os principais mecanismos para atravessar a membrana são relacionados abaixo:

1. Transporte Passivo

Difusão

Osmose (água)

Difusão facilitada

2. Transporte ativo

3. Endocitose

4. Exocitose

5. Canais iônicos

Na prática de hoje abordaremos a Osmose, que é um processo de Transporte Passivo, ou seja, sem gasto de energia.

Logo, a osmose se dá pela difusão da água através de uma membrana semipermeável, de forma que a água se mova de uma área de menor concentração de soluto para uma de maior concentração. A figura abaixo ilustra esta situação.

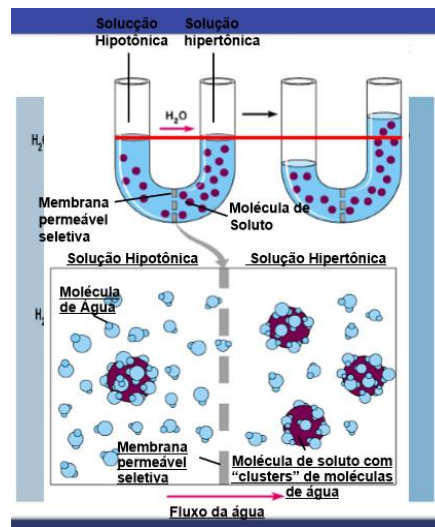


Figura 1 – Representação da Osmose. “Clusters” são aglomerados Fonte: http://www2.iq.usp.br/docente/henning/Disciplinas/Bioquimica%20QBQ230N/aula_transporte.pdf

A água se difundiu pela membrana por alguns mecanismos, sendo:

- Difusão direta através da membrana (atuação entre o citoplasma a membrana);
- Por pequenos espaços criados momentaneamente por dois fosfolípidos adjacentes;
- Por poros formados por proteínas permeáveis a água (aquaporinas).

Existem 3 classificações no processo de osmose e que são de interesse, sendo:

Meio isotônico: quando dois meios possuem a mesma concentração de espécies químicas.

Meio hipotônico: quando a concentração do soluto é menor que a concentração do solvente.

Meio Hipertônico: quando a concentração do soluto é maior que a concentração do solvente.

Assim, em função da variação da concentração, poderá ocorrer alteração na forma da célula, a chamada tonicidade. Objetivamente, tonicidade é a capacidade de uma solução reduzir ou aumentar o volume celular.

Mas afinal, qual a importância da osmose para os seres vivos em geral? (adaptado de Mundo Educação e Tortora *et al.*, 2012)

O nosso sangue apresenta uma pressão osmótica de cerca de 7,8 atm, sendo que as hemácias ou glóbulos vermelhos também. Isso permite a passagem fácil de moléculas de água para dentro e para fora das hemácias. É por isso que o soro fisiológico e as injeções intravenosas devem possuir a mesma pressão do sangue. Dessa forma, dizemos que o soro e os glóbulos vermelhos são isotônicos.

Outro exemplo é a ascensão da seiva nas plantas. As raízes das árvores funcionam como uma membrana semipermeável permitindo a passagem de água, ureia e outras substâncias, mas impedindo a passagem de íons sódio, glicose e outros. Como a solução que está dentro da raiz da planta é mais concentrada que a da terra, ocorre a passagem de água pela raiz para dentro da planta. Para que essa água suba e atinja todas as regiões da planta, a pressão osmótica pode atingir valores de 50 atm.

Para complementar esse assunto no âmbito dos vegetais, procure estudar sobre **capilaridade**, que é tendência que os líquidos apresentam de subir em tubos capilares ou de fluir através de corpos porosos, causada pela tensão superficial. Podemos dizer que a capilaridade é o processo em que ocorre a condução de um líquido por tubos muito finos. Isto se deve às propriedades de coesão e adesão da água, que respectivamente são, a união entre as moléculas de água, e a força entre um líquido e a superfície de um sólido.

E nas bactérias, o que pode ocorrer?

Alguns antibióticos (como a penicilina) danificam a parede celular bacteriana, induzindo o rompimento ou a lise celular. Normalmente isso ocorre porque o citoplasma bacteriano tem uma concentração muito alta de solutos, que quando a parede é enfraquecida, água adicional entra na célula por osmose, o que leva a sua ruptura. As bactérias gram-negativas apresentam paredes celulares mais fracas.

E nos animais, quais as implicações da Osmose?

Os animais aquáticos de água doce têm um grande problema para resolver, que é a chamada **osmorregulação**. Como a concentração de sais no fluido da

célula é maior é maior que no ambiente de água doce (isto é, os fluídos são hipertônicos), então a água doce tende a entrar na célula por osmose. Os animais de água doce, sejam os protozoários ou peixes com as suas guelras, necessitam de um mecanismo para excretar a água (são os vacúolos contráteis nos protozoários e rins nos peixes). Por isto a dificuldade de espécies de água doce “invadir” ambientes marinhos. Já os animais marinhos são hipotônicos (corpo tem conteúdo salino inferior ao do mar), desenvolveram um metabolismo que implica na excreção do sal e retenção da água no corpo celular (ODUM, 2004).

E quais são as possibilidades para o uso dos conhecimentos sobre Osmose?

Em uma rápida busca nos sites de pesquisa científica, você verá o uso da Osmose em tratamento de águas residuárias, dessalinização da água do mar, cultivo por meio de hidroponia, tratamento de água na indústria farmacêutica, e outras mais.

E o que vem a ser osmose reversa ou osmose inversa?

Como não é o tema desta aula, seremos sucintos.

Ocorre quando aplica-se um gradiente superior a pressão osmótica for aplicado do lado da solução mais concentrada, de forma que haverá o fluxo da água do lado mais concentrado para o mais diluído, fenômeno este chamado de osmose reversa. Cabe destacar que a passagem da água se dá por meio de uma membrana semipermeável, da solução concentrada para diluída, mas que na verdade se dá da solução de maior energia para menor energia, de forma similar a que ocorre com a osmose (METCAL e EDDY, 2016).

São propostas 5 práticas.

Prática 1: osmose com as folhas de alface

Primeira parte:

Materiais: Alface fresca; Água; 1 prato ou vasilha; Geladeira.

Passo a passo:

- 1 – Colocar a folha de alface em uma vasilha sem tampa na geladeira por 24h. A folha perde água na geladeira devido ao fluxo do ar frio e seco no seu interior.
- 2 – Decorridas as 24h, colocar a mesma folha de alface em uma vasilha com água (levemente submergida) e aguardar por 3h.

Exercício:

1 – Registre em seu caderno ou relatório o que aconteceu com a folha de alface. Quais seriam os motivos para este comportamento?

Segunda parte:

Materiais: Alface fresca; Água; 1 prato ou vasilha; geladeira; 1 colher; Sal de cozinha

Passo a passo:

1 - Coloque uma folha de alface em um recipiente e adicione sal (aproximadamente uma colher de chá).

2 – Aguardar por aproximadamente 3h, até que a folha perca e fique aparentemente murcha.

Exercício

1 – Anote no seu caderno o relatório o que ocorreu. Qual seria a explicação para este fenômeno?

Prática 2: osmose com células da folha de *Elodea*

A *Elodea* é uma planta ornamental usada em aquários e que pode ser facilmente adquirida em lojas especializadas. É uma monocotiledônea da família *Hydrocharitaceae*.

Materiais: Folhas de *Elodea*, microscópio, pipeta Pasteur, lâmina, lamínula, NaCl e papel de filtro.

Passo a passo:

1 - Com uma pinça de ponta fina, coletar um pedaço com cerca de 0,5 cm da folha de *Elodea*.

2 - Colocar o pedaço de folha sobre a lâmina. Usando a Pipeta Pasteur ou contagotas, pingue uma gota de água sobre o mesmo. Cobrir a preparação com uma lamínula.

3 – Pressione levemente a lamínula para retirar as bolhas de ar.

4 – Observar ao microscópio seguindo os cuidados observados na aula 2.

5 – Usando o frasco contendo a solução de NaCl pingue em um dos lados da lamínula uma gota da solução. Encostar um pedaço de papel de filtro do lado oposto

ao que foi pingada a solução de NaCl de forma a substituir a água pelo cloreto de sódio.

6 – Observar novamente ao microscópio e registrar.

OBS.: Colocar sal de cozinha (NaCl) em água destilada até que deixe de formar uma solução.

OBS.: Para uso da objetiva de 100x, use o óleo de imersão, pois ele possui interface líquida no mesmo índice de refração da objetiva. A sua utilização impedirá que os raios luminosos não se dispersem ao atravessarem o conjunto lâmina-óleo, permitindo a entrada de um grande cone de luz na objetiva, o que melhora a visualização do material. Pingue uma pequena gota do óleo em cima da lamínula somente quando for visualizar com a objetiva de 100x. Atente-se quanto aos cuidados de segurança mencionados na aula 2 (risco de quebra da lâmina e lamínula).

Exercícios

1 - Por que podemos ver facilmente os cloroplastos, mas não o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático ou as mitocôndrias?

2 – Quais estruturas celulares foram observadas?

3 - Qual a evidência observável de que ocorreu perda de água do interior da célula para o meio externo quando a *Elodea* foi colocada em uma solução concentrada de cloreto de sódio?

4 - A solução de NaCl é hipotônica ou hipertônica em relação ao meio interno da célula?

5 - É possível prever o que ocorrerá com as células da *Elodea* se forem retiradas da solução de cloreto de sódio e colocadas novamente em água? Justificar a sua resposta e lembre-se da variável “tempo”.

Prática 3: osmose com sangue de boi

Breve introdução: A hemácia contém um pigmento de coloração vermelha chamada hemoglobina, que é uma proteína presente nos eritrócitos (hemácias), constituindo aproximadamente 35% de seu peso. Tem a função de transportar o

oxigênio, levando-o dos pulmões aos tecidos de todo o corpo. Além disso tem a função de transportar nutrientes para as células e recolher as suas excretas.

Materiais: 12 tubos de ensaio para centrífuga; 2 pipetas de 5mL; 1 litro de solução de NaCl a 1,0% ; sangue: 1,5 ml por bateria de 12 tubos ; 1 litro de água destilada; 2 suportes para tubos de ensaio e caneta para escrever em vidro.

Etapa 1:

Passo a passo:

1 - Prepare os 12 tubos de ensaio de acordo com a tabela abaixo, numerando-os com caneta. Para colocar as duas substâncias nos tubos utilizem duas pipetas individualizadas.

Tabela 1 – Identificação dos tubos

Frasco	NaCl 1%	água destilada	concentração (%)
1	10 ml	0,0 ml	
2	8,5 ml	1,5 ml	
3	7,5 ml	2,5 ml	
4	6,5 ml	3,5 ml	
5	6,0 ml	4,0 ml	
6	5,5 ml	4,5 ml	
7	5,0 ml	5,0 ml	
8	4,5 ml	5,5 ml	
9	4,0 ml	6,0 ml	
10	3,5 ml	6,5 ml	
11	3,0 ml	7,0 ml	
12	2,5 ml	7,5 ml	

2 - Pingue 2 gotas de sangue em cada tubo. Agite levemente.

3 - Observe atentamente os 12 tubos e após 10 minutos descreva o observado.

4 - Agite seguidamente os 12 tubos, para manter homogênea a suspensão.

Exercícios

1) Observe para responder: Há diferenças entre os níveis de turbidez nos tubos, isto é, quanto cada solução está límpida ou turva? O que isto significa? Levante especulações, inclusive em relação ao tempo de coleta da amostra de sangue (efeito da coagulação)

Etapa 2:

Passo a passo:

1 – Com os 12 tubos já preparados e observados, coloque-os na centrífuga por 5 minutos a 2500 rpm.

Exercício

1) Que relação pode ser estabelecida entre a cor da solução com o tamanho do depósito no fundo de cada tubo? Discuta os resultados.

Prática 4: osmose com açúcar e saco celofane

Materiais: 2 béqueres; 1 saco de celofane (que é uma membrana seletivamente permeável e preenchido com solução de sacarose a 20% - açúcar de mesa); rolha de borracha, água destilada, tubo de vidro e anel de borracha.

Passo a passo

1 – Coloque a sacarose dentro do saco celofane (já diluída).

2 – Transpasse o tubo de vidro pela rolha de borracha e fixe-a (vendando-a) com o anel de borracha.

3 – Submerja em um béquer com água destilada, procurando centralizar o saco de celofane no mesmo. O nível da água destilada deverá ser imediatamente superior ao da rolha de borracha. Observe a figura abaixo quanto ao comportamento esperado.

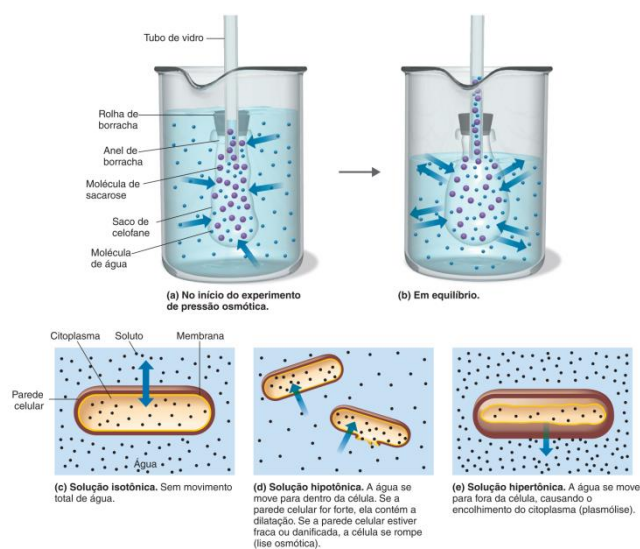


Figura 2 – Osmose. Fonte: Tortora et al. (2012).

Exercício

1 - Explique a osmose ocorrida neste experimento.

Prática 5: vidrarias, guardanapo e água com corante (para fenômeno da capilaridade)

Materiais: 2 béqueres de 200 mL, água destilada com corante e guardanapo.

Passo a passo:

- 1 – Coloque a água destilada em um dos béqueres.
- 2 – Dobre o papel toalha em camadas, até tornar a forma de um “canudo”.
- 3 – Com os béqueres paralelos, dobre o papel toalha ao meio e submerja no béquer com o líquido, deixando a outra metade para dentro do béquer vazio.
- 4 – Observe o que acontecerá decorrido 1h.
- 5 – Você pode colocar algum objeto sob um dos béqueres e observar o comportamento do líquido após algumas horas.

Exercício

- 1 – Observe os fatos relevantes no seu relatório e explique o motivo da transferência do líquido pelo guardanapo.

Referências

Biblioteca Digital de Ciências da Unicamp. Aula 1: Osmose em célula vegetal observada ao microscópio óptico. 2011. Disponível em: <

<https://www2.ib.unicamp.br/lte/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=1102#.WsQ1JUXFzIU> >. Acesso: 22 jan. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al.. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

3.2 - EXTRAÇÃO DO DNA VEGETAL

Objetivos

- * Compreender o DNA como chave da vida
- * Compreender as reações que permitiram visualizar o aglomerado (nuvem) da fita de DNA

Duração: 4 aulas

O DNA

O DNA, molécula de Ácido Desoxirribonucleico, teve estudos consagrados com James Watson e Francis Crick, em 1953, vindo a descobrir a estrutura de dupla hélice das duas longas fitas de DNA que se enrolam.

Há ferramentas modernas para identificação do DNA, a saber: PCR (Reação em cadeia da polimerase) que permite ampliar regiões específicas da fita de DNA; e a eletroforese em gel, que permite separar e analisar macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) e seus fragmentos baseando-se no tamanho e polaridade delas. Logo, ao final deste experimento será possível visualizar milhares de fitas de DNA juntas.

Para visualização do DNA vegetal é preciso dissociar o tecido da planta, romper a parede celular e as membranas plasmática e nuclear, remover as proteínas e isolar o DNA. O procedimento para extração do DNA em células animais é basicamente o mesmo.

Destaca-se que a totalidade do DNA extraído será composta por várias réplicas das mesmas moléculas, uma vez que inúmeras células do mesmo organismo serão degradadas para que possamos visualizar o DNA.

Cabe ressaltar que estudos de DNA passam necessariamente pela necessidade do ISOLAMENTO da molécula.

Muita atenção

Com a aplicação desses materiais, há a formação de uma fração superior na fase alcoólica, de aspecto gelatinoso, mais denso e com abundantes bolhas de ar. Essa fração é usualmente apontada como sendo DNA, correspondendo na realidade à fração de pectina. Uma forma fácil de distinguir em uma extração a fração correspondente ao DNA daquela de pectina é reparar na consistência da camada onde ela se apresenta. O DNA precipita com o álcool e fica na parte inferior da fase alcoólica, logo acima da fase aquosa. A pectina fica na superfície da fase alcoólica, apresenta consistência gelatinosa e abundante bolhas de ar. O DNA precipitado forma um emaranhado de filamentos muito finos, semelhantes a fios de algodão, e com aspecto de “nuvem”. Ao tentar “pescar” o DNA com uma pipeta de Pasteur ou bastão de vidro, este gruda e apresenta aspecto de filamentos muito finos que não se desagregam, enquanto a pectina apresenta uma consistência de geleia que goteja e se desmancha.

Para evidenciar a fração contendo pectina, é possível conseguir sua dissolução mediante a adição da enzima pectinase, o qual degrada a pectina em solução (Rodrigues e cols., 2009).

Método

Materiais utilizados

- 1/3 de banana e/ou 02 morangos e/ou ¼ de cebola grande;
- 01 faca de cozinha;
- 02 copos de Becker ou potinho graduado;
- 01 coador de chá ou peneira
- 01 pilão ou saco para macerar;
- 02 tubos de 50 mL com tampa;
- 01 colher de chá;
- 01 pote plástico grande para manter o álcool gelado;
- gelo;
- água quente (65°C);
- 01 pano de limpeza;
- álcool etílico 90° gelado (a temperatura de 10°C);
- solução de lise (água+ detergente + sal de cozinha).
- balança de precisão

Passo a passo:

Observações:

- É aconselhável realizar a prática, antes da aula, para ajustar as quantidades relativas de tecidos a partir dos quais o DNA será extraído e a relação entre os volumes do macerado e do álcool;
- É aconselhável usar água quente na mistura com sal e detergente (cerca de 65°C), uma vez que o tempo de incubação está reduzido.

Banana ou cebola

1 – Ligar o banho Maria a 65°C.

2 – Colocar água em 2/3 do béquer e adicionar 6 ml de detergente e 4 g de sal, sem fazer demasiada agitação (misturar suavemente sem promover espuma).

3 – Cortar a cebola em pedacinhos e adicionar no béquer (item 2).

- 4 – Tampe o béquer com filme plástico e coloque no banho Maria (65°C) por 15 minutos.
- 5 – Filtrar com filtro de papel até atingir a metade de um novo béquer.
- 6 – Tampe o béquer com filme plástico e coloque em uma bacia com gelo por 5 minutos.
- 7 – Retire o béquer da bacia e adicione lentamente o álcool (que estava no congelador), escorrendo pela parede de béquer.
- 8 – Deixe descansar por 5 minutos e o DNA surgirá na interface entre a água e o álcool.
- 9 – Com o auxílio de um palito faça a “coleta” do DNA (formato de “nuvem”)

Morango

- 1 – Esmagar o morango no saco plástico (retirar apenas as folhas do ápice e cortar em pedaços) e adicioná-lo em um béquer de 200 ml.
- 2 – Adicionar 50 ml de água.
- 3 – Adicionar 6 ml de detergente e 4g de sal.
- 4 – Misturar e aguardar em repouso por 10 minutos em Banho Maria.
- 5 – Filtrar a solução em outro béquer (antes de passar para o passo 6 você pode manter no béquer ou passar para um tubo de ensaio).
- 6 – A partir da quantidade de “suco de morango” obtida adicione a mesma quantidade de álcool gelado.
- 7 – Observar a formação da “nuvem” de DNA formada na interface da água com o álcool.

O quadro abaixo apresenta as interações de cada um dos materiais utilizados:

Quadro 1 – Finalidade dos materiais utilizados

MATERIAL	FINALIDADE
Maceração	<p>A cebola (morango ou banana) deve ser macerada para que a parede celular (estrutura espessa é rígida presente em células vegetais) seja rompida.</p> <p>A aplicação de força mecânica pode também romper a membrana plasmática de algumas poucas células, embora esta estrutura deva ser desestruturada quimicamente. Além disso, o maceramento dissocia os tecidos, permitindo que a solução de lise (detergente + sal) aja sobre um número maior de células, liberando um grande número de moléculas de DNA. Assim, a cebola (morango ou banana) deve ser muito bem macerada para garantir um bom rendimento do experimento.</p>

Peneirar	Peneirando o material é possível separar restos de estruturas celulares da solução contendo DNA de outras moléculas.
Banho Maria	O aumento da temperatura promove uma maior agitação molecular, o que ajuda o detergente a desestabilizar as membranas lipídicas. Além disso, a alta temperatura inativa as enzimas que podem degradar o DNA (DNAases).
Detergente	As membranas plasmática e nuclear são compostas principalmente por lipídios. A função do detergente é desestruturar as moléculas de lipídio das membranas biológicas. Dessa maneira, as membranas sofrem ruptura e todo conteúdo celular- inclusive o DNA- fica disperso na solução.
Sal de Cozinha	A adição do sal (NaCl) no início da experiência proporciona um ambiente favorável para a extração, pois o sal, depois de dissolvido na água, se dissocia e contribui com íons positivos que neutralizam a carga negativa do grupo fosfato do DNA. As moléculas de DNA passam a não sofrer repulsão de cargas entre si, o que favorece sua aglomeração.
Álcool	O álcool desidrata o DNA, de forma que este não mais fica dissolvido no meio aquoso. Além disso, o DNA tende a não ser solúvel em álcool e, deste modo, suas moléculas se agrupam. Como o DNA tem menor densidade que os outros constituintes celulares, ele surge na superfície do extrato (sobrenadante na solução de álcool etílico, que tem o aspecto de uma “nuvem”). Quanto mais gelado o álcool, menos solúvel será o DNA.

Fonte: Adaptado de Silva et al. (2015); Projetos educacionais; http://educar.sc.usp.br/licenciatura/2003/siteprojeto/2003/2_extracao_DNA_cebola_com_pla_no.pdf

DNA humano da bochecha

E o DNA humano, seria possível visualizar? Uma prática comum é utilizada nos laboratórios para ensino de Biologia. Abaixo segue o protocolo:

Materiais: detergente, sal de cozinha, álcool etílico 90° gelado (a temperatura de 10°C); copo, colher, béquer e balança de precisão (ou siga as instruções usando a colher como medida), corante azul, copo com água e bastão de vidro

Passo a passo

1 – adicionar uma colher de sopa de sal em um copo de 200 ml com água e misture bem

- 2 – Separe 4 colheres da água com sal em outro copo para fazer o bochecho
- 3 – Bochechar por 1 minuto e devolve-la no copo
- 4 – adicionar uma gota de detergente e misturar vagarosamente com o bastão de vidro, de forma a não gerar espuma (misturar por 10 s aproximadamente)
- 5 – Separar meio copo com álcool e adicionar 3 gotas de corante (misturar vagarosamente)
- 6 – adicionar lentamente o álcool no copo com água/saliva, lentamente, pela parede do copo e aguardar 2 minutos.
- 7 – verificar se houve a formação da “nuvem” do DNA. Usar o bastão de vidro para remoção.

Exercícios

1. Por que o material precisa ser macerado para isolar o DNA?
2. Qual o papel do detergente presente na solução de lise no processo de extração do DNA?
3. De que é composta a molécula de DNA?
4. Visto que o DNA não é solúvel em álcool, o que ocorre com suas moléculas quando colocadas neste meio?
5. Por que você não pode ver a dupla hélice do DNA extraído?
6. Considerando os procedimentos da extração do DNA genômico, você espera obtê-lo sem quebras mecânicas e/ou químicas?
7. O DNA humano foi mais facilmente visualizado que o DNA vegetal? Comente.

Referências

- SILVA, A. T. *et al.* CONTRIBUIÇÕES DA ATIVIDADE PRÁTICA PARA O ENSINO E A APRENDIZAGEM DE BIOLOGIA: EXPERIÊNCIA COM A EXTRAÇÃO DO DNA DO MORANGO. **I Congresso de Inovação Pedagógica em Arapiraca: Perspectivas atuais dos profissionais da Educação**. 2015. Disponível em: < <http://www.seer.ufal.br/index.php/cipar/article/view/1886> >. Acesso: 19 Mar. 2018.
- FURLAN, C. M. *et al.* Extração de DNA Vegetal: O que Estamos Realmente Ensinando em Sala de Aula? **Revista QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**. Vol. 33, N° 1, FEVEREIRO 2011. Disponível em: < http://qnesc.sbg.org.br/online/qnesc33_1/05-RSA6409.pdf >. Acesso: 18 mar. 2018.

3.3 – AULA EXTRA: VISUALIZAÇÃO DE FUNGOS DISCUTIDOS EM AULA TEÓRICA

Objetivo

- * Comentar as características gerais do Reino Fungi;
- * Observar as estruturas dos fungos filamentosos;
- * Treinar a visualização de lâminas ao microscópio.

Duração: 2 aulas (mas o material deverá ser previamente preparado)

Método

Materiais

- uma laranja
- uma fatia de pão
- recipiente de plástico com tampa e que caiba a laranja
- um prato e um pires
- alguns palitos de dente limpo
- um pouco de água
- microscópio, lâmina e lamínula

Passo a passo:

- 1 – Coloque a laranja dentro do recipiente e tampe. Coloque o pedaço de pão umedecido no prato e tampe-o com o pires. Em um outro recipiente, dividido ao meio, coloque o pão e a laranja, porém expostos ao ambiente e sem umedece-los.
- 2 – Guarde os dois tratamentos sobre a bancada por 7 dias.
- 3 – Retire uma amostra da região do “mofo” com o palito de dente (use a alça flambada, caso disponha deste recurso) e faça a preparação da lâmina, como já apresentado na Unidade 2 deste Roteiro.
- 4 – Observe ao microscópio.

Exercícios

- 1 - Responda: por que foi necessário umedecer o pão? E ainda, qual ou quais estruturas você conseguiu identificar?
- 2 – Os fungos foram facilmente visíveis nas 3 amostras após 1 semana? Justifique relatando as principais possibilidades para explicar os resultados alcançados.

Referências

USP – Universidade de São Paulo. Aula prática de Microbiologia. Com adaptações. Disponível em: < <http://www.ib.usp.br/inter/0410113/downloads/asco2014.pdf> >. Acesso: 27 de Fev. 2019.

UNIDADE 4: TÉCNICAS DE ESTERELIZAÇÃO

4.1 - TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO

Objetivo

- * Conhecer as principais técnicas de esterilização dos microrganismos;
- * Diferenciar os termos “limpeza”, “asepsia”, “esterilização” e outros;
- * Conhecer a operação da Autoclave, bem como os riscos relacionados.

Duração: 4 aulas

Breve conceituação

O crescimento de microrganismos em uma rotina laboratorial deve ser controlado ou inibido, a depender da situação de trabalho.

São condições que afetam a sobrevivência dos microrganismos, dentre outras:

- a) Tamanho da população na amostra
- b) Tempo de exposição a um agente microbiocida
- c) Temperatura a qual o microrganismo é exposto
- d) Local em que o microrganismo se encontra na vidraria ou objeto
- e) Características do microrganismo
- f) Condições ambientais (temperatura, pH, predação, competição e outras)

Alguns conceitos:

- a) Desinfecção é a inativação ou redução do número de microrganismos presente em um meio, não implicando na sua eliminação total. Visa eliminar o potencial infeccioso ou patógeno existente. Um exemplo clássico é a adição de Cloro no processo de tratamento de água.
- b) Asepsia é o impedimento da entrada de microrganismo na área de trabalho.
- c) Esterilização é a eliminação de toda e qualquer forma de vida presente em um determinado material, ambiente ou meio de cultivo (removem por completo).
- d) Sanitização é o tratamento que induz à diminuição da vida dos microrganismos. Muito aplicado na indústria de alimentos e itens de saúde pública.

- e) Antissépticos são biocidas que destroem ou inibem o crescimento de microrganismos em tecidos vivos (asepsia das mãos, região da aplicação de injeções e outros)
- f) Desinfetantes são semelhantes ao antisséptico, mas usado em objetos e superfícies inanimadas.
- g) Preservação é a prevenção da multiplicação de microrganismos em produtos formulados, como alimentos e fármacos.
- h) Limpeza é o procedimento de remoção de resíduos diversos de objetos, e deve ser precedida de desinfecção e esterilização.

OBS.: microrganismos, em especial bactérias na fase esporulada, podem resistir a temperaturas altas (superiores a 100°C).

Alguns meios para esterilização são amplamente empregados, sendo:

Meios físicos:

- a) Calor seco: - Estufa - Flambagem
- b) Calor úmido: Fervura – Autoclave
- c) Radiações - Raios alfa - Raios gama - Raios x

Meios químicos: Desinfetantes

Outros agentes:

Formaldeído e iodo, ambos associados ao álcool;

Flambagem no bico de Bunsen ou vela (calor chega a 1000°C)

A incineração de alças bacteriológicas e pinças é uma boa opção via bico de Bunsen. Pode ser associado ao uso do álcool posterior ao uso e LONGE DA CHAMA, principalmente nos casos onde possa ocorrer liberação de gases ou outras partículas.

A radiação ultravioleta (onda de 100 a 400 nm) deve ser comedido, haja vista ser prejudicial a tecidos humanos, podendo causar câncer, rugas na pele e até queimadura.

Preparo de materiais para esterilização

1 – preparo de tubos de ensaio com tampas

- a) Esvaziar o conteúdo do tubo e colocar de molho em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro por no mínimo 24 horas;

- b) Lavar com detergente, enxaguar aproximadamente 10 vezes, lavar mais uma vez com água deionizada e levar para secar em estufa a 100°C;
- c) As tampas devem seguir o mesmo procedimento que o tubo, mas em estufa a 50°C;
- d) Para esterilização: colocar a tampa nos tubos ou rolha nos que não tem a rosca/tampa. Nos tubos com rosca, manter a tampa levemente sobre o tubo para permitir a troca do ar com o ambiente da autoclave ou estufa. Se direcionada para a estufa, embrulhar em papel Kraft em grupos de três ou cinco. Esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min, ou em estufa a 180 °C, por 2 horas. Identificar com nome, volume e data de esterilização.

2 – Preparo e esterilização das pinças

- a) Lavar em água corrente com detergente, embrulhar em papel Kraft ou papel alumínio;
- b) Esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min, ou em estufa a 180 °C, por 2 horas;
- c) Identificar com nome, data de esterilização e prova de esterilização.

3 - Ponteiras descartáveis usadas

- a) Esterilizar em autoclave a 121+/-1 °C, por 30 minutos e descartar.

4 - Utilização de estufas para incubação

- a) Colocar termômetro no seu interior para confirmação da temperatura estabelecida no painel do equipamento. A temperatura dependerá do material incubado, mas deve oscilar em mais ou menos 1°C.

5 - Acondicionamento de material analítico

- a) Placas que se destinam à cultura de bactérias são incubadas invertidas. Isso é importante porque a evaporação do Ágar pode formar gotículas e comprometer o crescimento do microrganismo, além de dificultar a sua “fixação” no meio de cultura;
- b) Não sobrepor mais que cinco placas para garantir uma uniformidade de distribuição de temperatura.

6 – Limpeza do laboratório

- a) Fazer a limpeza com pano levemente umedecido e se possível com detergente;
- b) Remover todo o remanescente de espuma e umidade sobre a bancada e somente depois aplicar álcool 70.

7 - Preparação de placas de Petri e pipetas para esterilização

- a) Embrulhar 4 ou 5 unidades no máximo em papel Kraft;
- b) A temperatura em estufa é de 170°C por 2h;
- c) O papel que protege o material adquiere cor parda, não devendo escurecer em demasia e nem se tornar quebradiço.

OBS.: caso seja possível, pode ser utilizado *Bacillus subtilis* para a verificação da eficiência do processo de esterilização.

8 – Forno micro-ondas: usar detergente neutro e álcool 70.

9 – Geladeira

- a) A limpeza é feita mensalmente com água e detergente neutro;
- b) Após a limpeza, é feita a desinfecção com álcool 70%;
- c) O ideal é a utilização de duas geladeiras no laboratório, sendo uma para material para novas análises (meios de cultura, reagentes e outros materiais pertinentes às análises) e outra com exclusividade para material contaminado e cepas.

10 – Autoclave

- a) É um aparelho utilizado nos processos de esterilização a vapor e pressão, sendo empregados para materiais destinados a análises, meios de cultura e materiais contaminados para descarte;
- b) Para limpeza usar detergente neutro, esponja, jarra, água potável, água deionizada ou destilada;
- c) Materiais limpos e materiais contaminados são autoclavados em ciclos separados;
- d) O material limpo é esterilizado em autoclave à temperatura de 121 °C, com tolerância de 1 °C, por 15 minutos;

- e) A esterilização em excesso de meios de cultura pode alterar características bioquímicas, propriedades nutritivas e deteriorar a qualidade do meio.

Duas opções para avaliar a qualidade do ciclo da autoclave:

- a) Utilizar, a cada ciclo, fitas para autoclave que são esterilizadas junto com o material. Se ao final do ciclo perceber que houve o desenvolvimento de listras mais escuras na fita, é porque a temperatura de esterilização atingida;
- b) Avaliar a eficiência das esterilizações através do controle de eficiência biológica: Utilizar esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Devido à termorresistência dos esporos, estes somente são destruídos a uma temperatura de 120 ± 1 °C, por 15 minutos, com 1 atm de pressão.

Utilização dos bioindicadores

As ampolas são colocadas junto com o material a esterilizar, acondicionadas em tubo de ensaio para evitar que, no caso de rompimento de uma ampola haja contaminação. Após o ciclo da autoclave, as ampolas são incubadas a 55 °C, por 24/48 horas. Incubar junto uma ampola que não tenha sido esterilizada como prova de controle. Se a esterilização for eficiente não há crescimento de *Bacillus stearothermophilus* e a coloração violeta da ampola permanece inalterada.

Em caso de esterilização ineficiente, o crescimento dos bacilos é observado pela turvação do caldo e acidificação por fermentação dos açúcares e sua cor muda de violeta para amarelo. A ampola controle também muda de coloração passando de violeta para amarelo.

Pode-se usar como bioindicador o *Bacilo subtilis*.

Ambos não são patogênicos, mas este último é um dos mais resistentes ao calor.

11 - Agitador de tubos

- a) O agitador de tubos de ensaio é um aparelho importante no processo de análises microbiológicas, já que garante a homogeneização do conteúdo dos tubos de ensaio através de agitação circular;
- b) Antes e depois do uso, o agitador deve ser limpo com algodão embebido em álcool 70%.

12 - Contador de colônias

- a) O contador de colônias é um utensílio que auxilia na contagem das colônias de microrganismos cultivadas nas placas de petri, através de sua observação na lupa, e com iluminação;
- b) Depois do uso, o equipamento deve ser limpo com algodão embebido em álcool 70%.

13 - Pesagem de amostras

- a) A pesagem correta das amostras é de suma importância para a inocuidade da amostra e sua proporcionalidade em relação ao diluente;
- b) Desinfetar com algodão e álcool 70% e ligar a balança;
- c) Ligar a chama ou utilizar a capela de fluxo laminar.

Preparação do álcool 70

O grau Gay Lussac ou ° GL representa o volume de soluto presente em 100 volumes da solução (soluto + solvente, etanol + água), a 20 ° C.

A solução alcoólica apresenta boa ação germicida na concentração de 70%. Quando puro, o álcool é menos eficaz que quando misturado à água, pois esta facilita a desnaturação da proteína, ligada a ação antimicrobiana do álcool. Quando associado a algum emoliente (abrandar, como a água), o álcool tem sua atividade bactericida prolongada, por meio do retardamento da sua evaporação, com diminuição também do ressecamento e irritação provocadas na pele pelo uso repetido.

O processo de diluição de soluções de álcool é simples e pode ser feito seguindo a seguinte fórmula:

$$C_f V_f = C_i V_i$$

Onde,

C i = Concentração inicial (concentração do álcool na solução pura)

V i = Volume inicial (volume do álcool na solução pura)

C f = Concentração final (Concentração desejada)

V f = Volume final (Volume desejado)

Se o álcool adquirido tiver concentração igual a 96%, o cálculo para diluição deverá ser feito da seguinte forma:

(concen. desejada %) X (vol. desejado ml) / concen. álcool na solução pura % =
volume de solução pura ml

Exemplo: Concentração desejada = 70%

Volume desejado = 1 litro (1000 ml)

Concentração de álcool na solução pura = 96%

$70\% \times 1000 \text{ ml} / 96\% = 729,16$

Assim: O volume de álcool puro a ser utilizado será de 729,16 ml, completando-se o volume com água destilada até atingir 1000 ml, isto é, acrescentar 270,83 ml de água.

OBS.: Devido à volatilidade do álcool, é importante manter a pisseta sempre fechada (inclusive o esguicho) podendo colocar um papel alumínio na sua extremidade.

Exercícios

- 1 – Elenque passo a passo para operação da autoclave
- 2 – Quais são os principais riscos para operação da autoclave?
- 3 – Diferencie esterilização de desinfecção.
- 4 – Quais os fatores que podem interferir na sobrevivência dos microrganismos em termos de vidrarias e ambiente laboratorial?
- 5 – Por que usualmente se utiliza o Álcool 70 em detrimento de outras concentrações?

Referências

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

SALVATORI, R. U. **Laboratório de Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e procedimentos operacionais padrões**. Org. Rosângela Uhrig Salvatori, Greice Aline Kaisekamp Wolf, Fabíola Dresch e Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen - Lajeado: Ed. da Univates, 2013. 72 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

USP – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. **POPs de rotina de laboratório.** Disponível em: <
http://www.icb.usp.br/cibio/index.php?option=com_content&view=article&id=60&Itemid=58>. Acesso: 27 Fev. 2019.

UNIDADE 5: PREPARO DE MEIO DE CULTURA

5.1 - MEIOS DE CULTURA

Objetivos

- * Desenvolver habilidade em manuseio de vidrarias;
- * Compreender a necessidade nutricional dos microrganismos em função das características do Meio de Cultura;
- * Conhecer os principais Meios de Cultura comerciáveis.

Duração: 4 aulas

Os meios de cultura para cultivo de microrganismos

Meios de cultura é um conjunto de substâncias formuladas com a finalidade de fornecer nutrientes para que os microrganismos se multipliquem. Após o desenvolvimento (normalmente em placa de Petri ou tubos de ensaio), dar-se as etapas seguintes, como a identificação dos grupos presentes. Como vimos, a identificação pode ser morfológica, mas dada a magnitude de seres vivos e os avanços da ciência, associado ainda a eventuais alterações de natureza taxonômica, a biologia molecular é a mais utilizada para fins de confirmação taxonômica.

Os meios de cultura devem apresentar:

- a) Meio isotônico, ou seja, concentração de cloreto de sódio idêntica à fisiológica (relacionado ao processo osmótico);
- b) Esterilização (normalmente no ato de preparação do meio de cultura);
- c) Nutrientes para o metabolismo microbiano (concentração de carbono, nitrogênio e sais minerais).

Em relação ao estado físico, podem ser líquidos (denominados de caldo), ou gelificados, produzidos com o acréscimo de ágar ao meio líquido. Pode ter origem natural, sintético ou semissintético. O Ágar, meio de cultura amplamente utilizado, tem como fonte as Algas.

Os meios de cultura são classificados conforme a sua aplicação, conforme exposto abaixo:

- a) Meio de Enriquecimento: são preparações normalmente líquidas que promovem o aumento do número de bactérias. Alguns exemplos são: Caldo Brain Heart Infusion e o Caldo Tetratonato
- b) Meio de Transporte: não possuem nutrientes, apenas um agente redutor. Previne desidratação e oxidação enzimática dos patógenos presentes. Tem essa finalidade o Caldo Tioglicolato.
- c) Meio Seletivo: são exemplos o Ágar Manitol Salgado e Agar SS, utilizados para selecionar as espécies que serão isoladas e impedir o crescimento de germes.
- d) Meio Diferencial: promove uma mudança na coloração das colônias de bactérias, possibilitando a distinção de vários gêneros e espécies de microrganismos. Exemplos: Ágar Eosin Methilene Blue e Ágar Hektoen.
- e) Meio Indicador: possibilita a análise das propriedades bioquímicas dos microrganismos, facilitando sua identificação. Utiliza-se o Ágar Triple Sugar Iron (TSI) e Ágar Citrato de Simmons para essa função.

Existe uma infinidade de meios de cultura no mercado. Do ponto de vista microbiológico, nem todos os microrganismos são facilmente cultiváveis em meio de cultura. A escolha do meio de cultura dependerá do que se deseja investigar. Pode-se ainda adicionar ao meio de cultura algum antibiótico, quando há a necessidade de restringir o crescimento de bactérias, por exemplo, em uma determinada amostra. Alguns meios de cultura disponíveis são:

- a) Ágar: tem várias aplicações no laboratório de microbiologia e pode ser utilizado para isolamento de culturas puras.
- b) Ágar Sabouraud de dextrose: favorece o crescimento de diversos fungos. Pode incubar à temperatura ambiente. Em alguns casos (a depender do alvo do estudo), incubar por até 40 dias.
- c) Caldo BHI - BRAIN HEART INFUSION (ou cérebro e coração): Meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Para teste bacteriológico incubar a 35°C por 24h, já para fungos aguardar por 5 dias;
- d) Meio Stuart: para conservação de microrganismos patogênicos como *Pneumococcus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* entre outros.

Método

- 1) Para a nossa aula utilizaremos o Ágar Sabouraud. Preparar 330 ml, adicionando 22g e misturar no agitador magnético a 50°C;
- 2) Levar para esterilização na autoclave;
- 3) Verter nas placas de Petri, próximo à chama e com os cuidados de assepsia de praxe;
- 4) Deve-se observar há distribuição homogênea do meio de cultura na placa e na altura de 4 mm;
- 5) Ao resfriar (normalmente abaixo de 45°C), o Ágar solidifica na Placa de Petri;
- 6) Em seguida deverá armazenar as placas de Petri na geladeira para uso posterior (incubação).

As colônias crescerão tanto na superfície como também no interior do Ágar, como será observado em outras aulas.

Para que o crescimento seja preferencialmente na superfície, ao fazer a semeadura deve-se espalhar a amostra com bastão de vidro em “L”, pois assim minimiza acúmulo da alíquota e conseqüentemente falhas na contagem. É o chamado método do espalhamento da Placa.

Exercícios

- 1 – Há diferença quando se utiliza as expressões “Ágar” e “Caldo”?
- 2 – Por que o Ágar se solidifica abaixo de 45°C?
- 3 – Qual a composição básica do Ágar? E de outros meios de cultura?

Referências

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

5.2 – AULA INTEGRADA: ESTERILIZAÇÃO, MEIO DE CULTURA E CÉLULAS

Objetivos

- * Conhecer os procedimentos de esterilização mais adotados;

- * Utilizar meios de cultura alternativos;
- * visualização de células ao microscópio após cultivo em placa de Petri

Duração: 2 aulas

OBS.: Seguir orientação quanto ao uso de cada equipamento, em especial, da autoclave.

Seguir rigorosamente, até por questões de segurança, o protocolo de cada item desta unidade.

Esterilização de vidrarias para próximas aulas práticas e teste de contaminação de superfícies diversas com meio de cultura alternativo

Além da preparação das vidrarias (esterilização), esta aula tem por objetivo o teste com meio de cultura alternativo para posterior visualização no microscópio. Como dito anteriormente, o conteúdo das aulas 1 e 2 são constantemente retomados, seja por meio do manuseio das vidrarias ou a partir do uso do microscópio.

Limpeza de provetas, frascos de Erlenmeyer e béqueres

Lavar com água e detergente, utilizando esponja e escovete. Caso os materiais apresentem incrustações ou resíduos gordurosos, proceder à imersão destes em solução de hipoclorito de sódio a 2% (água sanitária) e detergente neutro. Enxaguar dez vezes (é apenas uma referência) com água corrente, enchendo e esvaziando totalmente a vidraria. Utilizar no último enxágue, água destilada ou deionizada. Deixar drenar a água das vidrarias e secar em estufa a 100 °C.

Preparo

- Colocar tampão de algodão hidrófobo e gaze no bocal dos frascos erlenmeyer. Cobrir com folha de alumínio ou papel Kraft e fixar com barbante, atilho ou fita adesiva tipo crepe;
- Cobrir os bocais das provetas e dos béqueres com folha de alumínio ou papel Kraft e fixar com fita adesiva tipo crepe, atilho ou barbante;
- Esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min.;
- No caso de pipetas, indicado estufa a 170 °C – 180 °C por 2 horas, sendo a pipeta colocado dentro da cápsula de inox;

- Identificar o material com data de esterilização e prova de esterilização, colocando-os em armário reservado para uso microbiológico.

Observação: Frascos destinados ao preparo de meios de cultura, que são submetidos à esterilização por autoclave no momento do preparo do meio, dispensam esterilização prévia.

Preparo das pipetas

- Retirar o algodão do bocal de cada pipeta com estilete de ponta fina ou agulha histológica;
- Imergir as pipetas em solução de hipoclorito de sódio a 2% (água sanitária) e detergente por 24 horas;
- Enxaguar em água corrente. Se necessário, imergir em solução de hexano alcalino até total eliminação dos resíduos. Enxaguar, tantas vezes quantas forem necessárias, até a eliminação completa dos resíduos. Enxaguar com água destilada ou deionizada. Secar em estufa a 100 °C;
- Colocar algodão hidrófobo no bocal das pipetas. Acondicionar em porta-pipetas ou embrulhar em grupos em papel Kraft ou ainda usar a cápsula de inox para fins de esterilização na estufa;
- Identificar o material com nome, quantidade, volume da vidraria e data de esterilização. Esterilizar em estufa a 170 °C, por 2 horas;
- Não é recomendável o uso da autoclave por poder acumular gotículas no interior da pipeta e ser um meio propício a desenvolvimento de microrganismos;
- Identificar o material com data de esterilização.

Preparo de tubos de ensaio

Esvaziar o conteúdo do tubo e colocar de molho em solução de hipoclorito de sódio a 2% (água sanitária) e detergente neutro por no mínimo 24 horas.

Lavar com água e detergente, utilizando escovetes e esponjas para retirar resíduos internos. Enxaguar em água corrente. Colocar, se necessário, os tubos em recipiente contendo solução hexano alcalino até total eliminação dos resíduos. Enxaguar dez vezes em água corrente (valor de referência), enchendo e esvaziando totalmente os tubos. Utilizar no último enxágue, água destilada ou deionizada.

Deixar escorrer bem toda a água, colocar os tubos para secar em estufa a 100 °C.

Tampas

Imergir em solução de hipoclorito de sódio a 2% (água sanitária) e detergente neutro por no mínimo 24 horas.

Lavar com água e detergente. Enxaguar dez vezes em água corrente (valor de referência). Utilizar no último enxágue, água destilada ou deionizada. Deixar escorrer a água e secar em estufa a 50 °C.

Atenção: Limpar geladeira, forno micro-ondas e centrífuga usando pano úmido com detergente neutro e depois álcool 70.

Considerações sobre o armazenamento

a) Placas de Petri: devem ser acondicionadas em estojos porta placas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesma dimensão, ou embrulhadas em papel Kraft em grupos de até dez placas;

b) Pipetas: Preencher o bocal com algodão e acondicionar em estojos porta pipetas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesmo volume com as pontas para baixo, na extremidade oposta à tampa do estojo. Proteger o fundo dos estojos com um chumaço de algodão ou gaze para evitar danos nas pontas das pipetas. Pode-se também embrulhar as pipetas individualmente em papel Kraft, lembrando-se de identificar a extremidade do embrulho que deve ser aberta no momento da análise, e anotar externamente o volume da pipeta;

c) Tubos de ensaio vazios: tampar com tampão de algodão ou de gaze, ou ainda com as respectivas tampas no caso dos tubos rosqueáveis. Acondicionar em grupos de 4 a 6 tubos de mesmo tamanho e volume, embrulhar com papel Kraft e vedar com fita crepe especial;

d) Frascos de homogeneização e outros frascos vazios tampados com tampão de algodão, gaze ou tampa própria: Cobrir a tampa ou o tampão com papel Kraft;

e) Espátulas, pinças, tesouras e demais utensílios: embrulhar individualmente com papel Kraft, lembrando-se de identificar a extremidade do embrulho que deve ser aberta no momento da análise.

Preparo de meio de cultura de baixo custo (utilização posterior do microscópio)

Materiais: 3 pacotes de gelatina incolor, 1 sachê de caldo de carne, 5 placas de Petri, 1 colher de chá de açúcar, e 300 mL de água destilada.

Método

- Aqueça a água e dissolva a gelatina na água. Para uma boa homogeneização utilize a isca magnética (“peixinho”) na chapa aquecedora;
- Acrescente açúcar ainda sob agitação
- Em Placas de Petri previamente limpas com álcool, distribua o líquido perto da chama do bico de Bunsen ou lamparina para evitar a contaminação pelo ar. Espere o meio de cultura esfriar e leve-o a geladeira para se solidificar. No caso do meio de cultura de gelatina, teste essa receita antes de aplicá-la em sala de aula para saber se será necessário modificar a quantidade de água. O ideal é que a gelatina não derreta mesmo na temperatura ambiente, e para tal recomenda-se volume de água destilada inferior ao recomendado no rótulo do produto. Não aqueça demasiadamente a água, pois poderá comprometer a gelificação da gelatina/meio de cultura.

ATENÇÃO: os meios de cultura apresentados não foram esterilizados. O ideal é levar o meio de cultura preparado no Erlenmeyer na autoclave e após esfriar distribuir nas placas de Petri, em seguida deixar na geladeira por 24h.

Procedimento após preparação do meio de cultura alternativo

- Passe o cotonete (por ora umedecido em água destilada) em superfícies diversas e distribua lentamente sobre a superfície da placa de Petri com o meio de cultura endurecido. Utilize alça microbiológica para esgotar o material na placa, o distribuindo em forma de estria;
- Coloque a placa na posição invertida (observar se haverá gotículas de condensação), identificada e à temperatura ambiente (foto período);
- Observe após 1 semana.

Exercícios

1 – Qual a importância da correta esterilização das vidrarias?

- 2 – O que vem a ser meio de cultura? Qual o motivo de utilizar meio de cultura alternativo em detrimento dos que estão disponíveis no mercado?
- 3 – O que foi possível observar na placa após 1 semana? É possível identificar as espécies? Quais as limitações para esta identificação?
- 4 – Qual a correta posição da placa de Petri ao ser incubada? Justifique.
- 5 – O que vem a ser inóculo?
- 6 – Quais são os principais cuidados operacionais a serem seguidos durante o manuseio das vidrarias e preservação dos microrganismos?

Referências

Biblioteca Digital de Ciências da Unicamp. **Aula 1: Hipóteses sobre a origem da vida e a vida primitiva.** Disponível em: <

<https://www.bdc.ib.unicamp.br/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=1451#.WslhwkxFzIV>>. Acesso: 22 jan. 2018.

SALVATORI, R. U. **Laboratório de Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e procedimentos operacionais padrões.** Org. Rosângela Uhrig Salvatori, Greice Aline Kaisekamp Wolf, Fabíola Dresch e Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen - Lajeado: Ed. da Univates, 2013. 72 p. Disponível em: <
https://www.univates.br/editora-univates/media/publicacoes/18/pdf_18.pdf >. Acesso: 25 Fev. 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al.. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

UFTP - Universidade Federal Tecnológica do Paraná. Disponível em: <
<http://paginapessoal.utfpr.edu.br/geraldomicrobiologia-pratica> >. Acesso: 22 jan. 2018.

5.3 – DILUIÇÃO SERIADA

Objetivos

- * Desenvolver a habilidade quanto o manuseio de vidrarias;
- * Compreender a necessidade da diluição seriada para contagem de microrganismos.

Duração: 2 aulas

Finalidade da diluição seriada

A diluição seriada tem a finalidade de facilitar a contagem dos microrganismos. Veja o exemplo: se em 1 ml de leite tem 10.000 microrganismos, teoricamente se este 1ml fosse semeado na placa de Petri, teríamos então 10.000 colônias, o que seria incontável. Agora se 1 ml for introduzido em um tubo de ensaio com 9 ml de água estéril, teoricamente teremos 1000 bactérias (diluição 10^{-2}), e assim sucessivamente. Embora subjetivo, acredita-se que a contagem de 30 a 300 colônias seja a mais “aceitável”.

Para reduzir o consumo de material esterilizado, comece a semeadura em Placas de Petri pela menor maior diluição, ou seja, crescente (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} ...).

A figura 1 ilustra o método de diluição seriada (TORTORA *et al.*, 2012).

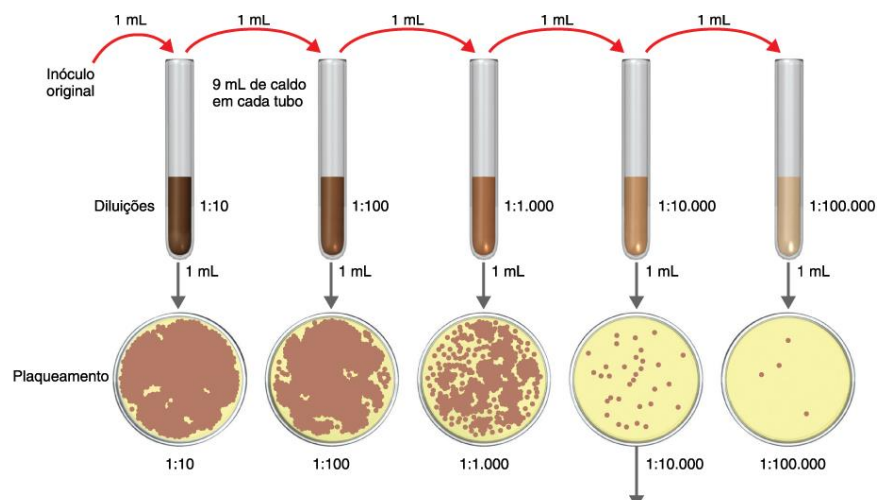


Figura 1 – Exemplo de diluição seriada e inoculação na placa de Petri correspondente. Fonte: Tortora *et al.* (2012)

5.4 - MEIOS DE CULTURA

Objetivos

- * Realizar a técnica de microcultivo a partir de uma cultura pré-estabelecida;
- * Desenvolver a habilidade em manuseio de vidrarias, operação da autoclave e outros procedimentos corriqueiros.

Duração: 4 aulas

Aprofundando os conceitos sobre Meio de Cultura

Ainda sobre o processo de investigação, após o processo de cultivo inicialmente escolhido, dar-se o processo do micro cultivo, que consiste em

selecionar colônias para nova incubação e assim facilitar a identificação dos microrganismos.

O procedimento é será como exposto na figura 2 abaixo. Insere um tubo de vidro em formato de “V” na Placa de Petri (no nosso caso utilizaremos o palito para churrasco). Em seguida coloca-se a lâmina com Ágar (um quadrado de 1 cm) e sobre ele é semeado a colônia segregada (mais facilmente isolada da placa anterior). Em seguida coloca-se a lamínula por cima. Na extremidade da placa coloca um pedaço de algodão umedecido (fonte de umidade) e deixa a placa incubada. Vale ressaltar que todo o material deverá ser autoclavado antes da semeadura (muito cuidado ao transportar esta placa de Petri).

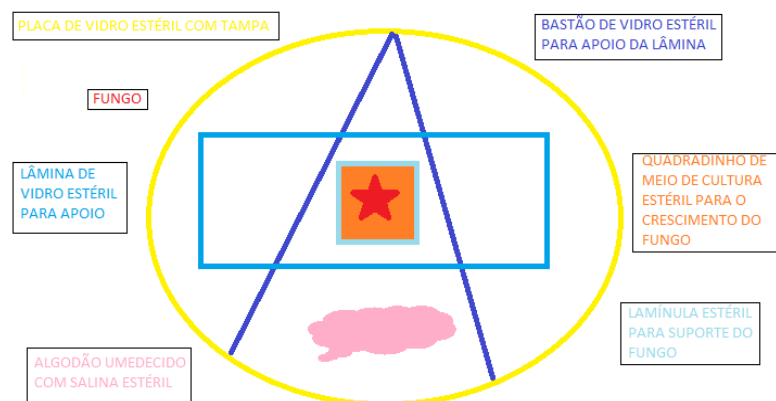


Figura 2 – Arranjo da placa de Petri para fins do micro cultivo. Fonte: própria.

Decorrido 1 semana, procede a coleta da amostra para análise morfológica ao microscópio óptico.

Algumas considerações

a) Os objetivos desta aula são: esterilizar vidrarias e meio de cultura (fiz para a primeira turma, mas esta deve preparar os materiais para as turmas seguintes); conhecer as finalidades dos meios de cultura, fazer a inoculação para fins de micro cultivo; realizar a diluição seriada;

b) Ficar atento aos cuidados de assepsia em todas as fases da análise;

c) Ao final de cada aula proceder a limpeza e esterilização dos materiais para a turma seguinte (devido limitação de vidrarias não fizemos a preparação para todas as turmas no dia anterior).

Resumo das etapas

a) Pesar 5g de solo e adicionar em Erlenmeyer com 45 ml de água destilada esterilizada (diluição 10⁻¹);

b) Fazer a diluição 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ nos tubos de vidro que já estão com 9ml de água destilada esterilizada. Para tal, fazer a transferência de 1ml entre os tubos, após agitação (o correto é uma pipeta para cada transferência). Sempre agitar o tubo de ensaio antes da transferência;

c) Colocar uma alíquota de 0,1 ml de cada tubo em cada uma das placas de Petri correspondentes (lembre-se de identificar os tubos e placas de Petri com a diluição e nome). Usar a alça de Drigalski para distribuir a alíquota (nós usaremos a alça de repicagem ou alça de semeadura). Proceder a incubação (em estufa a 37°C);

d) Na semana seguinte, para fins de micro cultivo, selecionar a placa de Petri com a colônia mais “facilmente” isolada de fungos. Fazer a coleta com a alça e semear na nova Placa de Petri (com Ágar sobre a lâmina). Proceder a incubação novamente (em estufa a 37°C);

e) Na semana seguinte fazer a identificação morfológica de estruturas fúngicas (no microscópio).

f) Em caso de bactérias é possível fazer a contagem das colônias em termos de UFC (Unidade Formadora de Colônia) e aplicar na fórmula abaixo, mas como foi dito, temos limitações para visualização de bactérias.

$$\text{UFC/g} = \text{n}^\circ \text{ colônias} \times \text{fator de diluição} / \text{volume da alíquota}$$

Exercícios

- 1) Qual a finalidade do meio de cultura?
- 2) Quais são os principais tipos de meio de cultura no que se refere ao microrganismo alvo?
- 3) Qual ou quais as vantagens e desvantagens da classificação morfológica de espécies?
- 4) Por que deve-se fazer a diluição seriada? Aplica-se a todas as amostras das mais diferentes matrizes? Justifique.

Referências

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

UNIDADE 6: OBSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

6.1 - OBSERVAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS

Objetivos

- * Visualizar protozoários ao microscópio óptico;
- * Preservar os protozoários em microambientes no laboratório.

Duração: 4 aulas

Os protozoários: “pequenos animáculos?”

Os protozoários agrupam uma gama de seres vivos, com diversas características, ao ponto de alguns biólogos vir a chamar o Reino Protista de “lixão da biologia”, numa alusão em que se direciona a este Reino o que a taxonomia não consegue êxito em classificar. A palavra “Protozoário” tem origem grega e quer dizer “primeiros animáculos”, assim classificados nos primórdios da taxonomia.

Os protozoários apresentam as seguintes características gerais (TORTORA et al., 2012):

- Animais unicelulares, com características variando desde espécies microscópicas na sua maioria, e espécies maiores chegando a algumas dezenas de milímetros, como os grandes esporozoários;
- O microrganismo *Paramecium* é utilizado para diferentes experimentos, bem como é citado para exemplificar os tipos de reprodução;
- A Ameba e outros tipos de protozoários, como os que possuem flagelos (flagelados) e os que possuem cílios (ciliados), também são alvo de profunda pesquisa científica;
- Constituem a maior e mais complexa população da terra e estão adaptados a uma infinidade de ambientes, sendo alguns parasitas;
- Alguns são patogênicos, como os causadores da doença de Chagas e da toxoplasmose;
- Há espécies de vida livre.

Materiais

Conta-gotas; Recipiente para cultivo; Algumas folhas de alface; Lâminas; Lamínulas; Microscópio; Clara de ovo.

Método

Vários métodos estão disponíveis, inclusive os mais avançados (USP, 2018). Adotaremos dos métodos abaixo (REGINA et al., 2015; MEC, 2015):

- a) Visualização do protozoário *Paramecium* em lâmina permanente (estojo com lâminas proveniente de outro *campus*);
- b) Coleta de água em um curso d'água do município, o qual recebe esgoto *in natura*. Você já aprendeu a preparar a lâmina nas nossas aulas iniciais (veja protocolo);
- c) Realizar o cultivo conforme procedimento abaixo:
 - a. Colocar água e algumas folhas de alface no recipiente e deixar em repouso por uma semana sobre a bancada do laboratório;
 - b. Decorrido uma semana, retirar uma alíquota com a pipeta e colocar sobre a lâmina e cobrir com a lamínula;
 - c. Observar os protozoários ao microscópio (observar ilustração no laboratório). Dica: adicionar uma gota da clara de ovo sobre a lâmina (antes de colocar a lamínula), pois facilita o acompanhamento do movimento destes microrganismos.

Exercícios

- 1) Faça um desenho esquemático sobre o que foi possível visualizar ao microscópio.
- 2) Morfologicamente foi possível perceber espécies diferentes? Justifique.
- 3) Existe alguma estrutura de locomoção presente nos protozoários? Cite-as.

Referências

MEC. Ministério da Educação. Portal do Professor. Protozoários: Reino Protista.

Disponível em: <

<http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=1884> >. Acesso: 20 jun. 2018.

PEREIRA, S. G.; FONSECA, G. A. G.; FELIZ, G. P. *et. al.* **MANUAL DE AULAS PRÁTICAS DE CIÊNCIAS E BIOLOGIA – COMPÊNDIO**. Faculdade Cidade de João Pinheiro. 150p. 2015. Disponível em: <

<http://fcjp.edu.br/pdf/20150619104130fc.pdf> >. Acesso: 20 jun. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10^a ed, 2012. 934p.

USP. Instituto de Medicina Tropical. Disponível em: <
<http://www.imt.usp.br/pesquisa/laboratorios/protozoologia/>>. Acesso: 20 Jun. 2018.

6.2 - PLAQUEAMENTO BACTERIANO E AVERIGUAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS

Objetivos

- * Realizar as duas formas de plaqueamento;
- * Aprimorar os cuidados de assepsia durante a manipulação das vidrarias e amostras.

Duração: 4 aulas

Conceitos iniciais

Existem 2 tipos de plaqueamento: plaqueamento em profundidade e plaqueamento por semeadura em superfície. A seguir tem-se as características entre eles:

- a) Plaqueamento por profundidade (ou *pour plate*) consiste em adicionar a amostra diluída, distribuir o meio de cultura em placa de Petri esterilizada até atingir a altura padrão de 3 a 4 mm (em placa de 90 mm de diâmetro é adicionado 15 mL a 20 mL de ágar). Em seguida homogeneizar fazendo movimentos em círculos. Aguardar o resfriamento e solidificação antes da incubação invertida da placa;
- b) Plaqueamento por semeadura em superfície consiste em distribuir o meio de cultura fundido em placa de Petri esterilizada até que se obtenha uma camada de no mínimo 3 mm a 4 mm (em placa de 90 mm de diâmetro é adicionado 15 mL a 20 mL de ágar). Após o resfriamento e solidificação do meio na placa de Petri, adicionar uma alíquota da amostra (que pode também ter passado por diluição seriada), e assim distribui a amostra por toda a placa com a alça de Drigalsky, proporcionando completa absorção da amostra no Agar.

Materiais

Solo, microscópio, placa de Petri, Meio de cultura TSA, autoclave, banho Maria, Pipeta, agitador magnético.

Método: adaptado de Tortora et al. (2012) e ABDI (2015):

- 1) Preparar a diluição 1:10 a partir de 5 g de solo em 45 ml de água destilada;
- 2) Fazer a diluição seriada 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ;
- 3) A partir de cada diluição, fazer a inoculação em profundidade e em superfície, com uma placa de Petri para cada;
- 4) Deixar em estufa a 35°C por 72h;
- 5) Após a incubação, contar as colônias em placa de Petri contendo de 30 a 300 colônias. O resultado do número de colônias obtido (média aritmética das duplicatas das diluições analisadas) deve ser multiplicado pela diluição da respectiva placa, expressando os resultados em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro. Se não houver nenhum crescimento nas placas inoculadas, o resultado será expresso em menor que 10, multiplicado pela recíproca da menor diluição inoculada e validada.

Exercícios

- 1) Quais foram as placas que apresentam maior crescimento, de profundidade ou superfície? Quais fatores poderiam proporcionar diferentes taxas de crescimento para uma mesma diluição quando comparados os tipos de plaqueamento?
- 2) Qual o motivo de se utilizar 5 g de solo como amostra inicial?
- 3) Quais os principais cuidados devem ser adotados para evitar os riscos de contaminação das amostras?

Referências

- ABDI – Associação Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **GUIA DE MICROBIOLOGIA. CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. PROCEDIMENTOS, PARÂMETROS, ORIENTAÇÕES E METODOLOGIAS ANALÍTICAS.** Parceria Sebrae. 1ªed. 2015. Disponível em: < <https://abihpec.org.br/guia-microbiologia/files/assets/common/downloads/Guia%20de%20Microbiologia.pdf> >. Acesso: 22 Jun. 2018.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

6.3 - IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E COLORAÇÃO GRAM

Objetivos

- * Aprimorar os cuidados de assepsia durante a manipulação das vidrarias e amostras;
- * Identificar grupos bacterianos ao microscópio a partir da técnica de Gram.

Duração: 4 aulas

A Técnica de Gram

A técnica de Gram foi idealizada por Hans Christian Gram em 1884. Os corantes aplicados visam facilitar a identificação e observação de estruturas celulares.

Os corantes podem ser compostos com íon positivo e íon negativo. O íon que dá cor é chamado de radical cromóforo.

Os corantes conhecidos como básicos tem a cor do seu íon positivo, enquanto que os ácidos tem a cor do íon negativo. A célula bacteriana é levemente negativa, portanto, atrai corantes básicos. Os corantes básicos mais comuns são: cristal violeta, azul de metileno e safranina.

As principais colorações são divididas em 3 grupos:

- 1) **Coloração simples:** tornar a forma e estrutura básica da célula mais visível;
- 2) **Coloração diferencial:** coloração em função dos diferentes tipos de bactérias;
- 3) **Coloração especial:** utilizada para identificar partes específicas dos microrganismos, como esporos, flagelos e ainda revelar a presença de cápsulas.

Já o lugol tem a finalidade de “realçar” a bactéria que apresenta-se Gram Positiva. O lugol é misturado ao Iodo, e com facilidade entram na parede celular, todavia, quando juntos apresentam dificuldade para sair. Assim, em caso de bactéria Gram positiva, elas tendem a permanecer com a cor roxa/violeta. Na camada Gram negativa o Álcool rompe a camada lipopolissacarídica e o material é removido através da fina camada de peptidoglicano, que não consegue reter o complexo (lugol).

Método

- 1) Identificar a lâmina;
- 2) Pingar solução salina;
- 3) Colocar a cultura com alça bacteriológica e realizar a técnica de esfregaço;
- 4) Secar por aproximadamente 30 s;
- 5) Passar 4 vezes ao fogo (Bico de Bunsen), sem contato da chama diretamente com a lâmina;
- 6) Cobrir a lâmina com Cristal Violeta e deixar por 1 minuto;
- 7) Lavar;
- 8) Aplicar Lugol por 1 minuto, cobrindo totalmente a lâmina;
- 9) Lavar;
- 10) Tombar e adicionar descorante por 10 a 20 s (opções: Acetona ou Álcool concentrado);
- 11) Lavar em seguida;
- 12) Aplicar Fucsina ou Safranina por 30 s e lavar em seguida;
- 13) Secar por baixo e passar ao fogo rapidamente.

Exercícios

1) Qual a importância e/ou aplicação para se fazer o teste de Christian Gram? (vale lembrar que a Técnica foi desenvolvida por Gram ainda no século XIX).

2) Todas as bactérias são Gram-positivas e/ou Gram-negativas? Justifique.

3) Há possibilidades para contornar as variações durante o experimento? (por exemplo, como padronizar a dosagem de reagentes entre as pessoas que realizam a técnica?)

Ver site sobre a Color Gram - <https://www.youtube.com/watch?v=BdE47TTue9I>

4) Para fins de identificação, qual seria a melhor indicação para obter a amostra a ser submetida ao teste de Gram?

5) Quais os cuidados que devem ser adotados para evitar variações analíticas em função dos materiais/reagentes a serem utilizados?

Referências

Biomerieux - <https://www.youtube.com/watch?v=BdE47TTue9I>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

6.4 - IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

Objetivos

- * Aprimorar os cuidados de assepsia durante a manipulação das vidrarias e amostras;
- * Verificar estruturas dos fungos filamentosos.

Duração: 4 aulas

Os fungos

A identificação dos fungos é baseada quase principalmente em sua morfologia, que pode ser do ponto de vista macro ou microscópico.

Macroscopicamente os fungos podem apresentar vários tipos morfológicos com colônias filamentosas, bolores e cremosas (leveduras) e com os mais diversos tipos de pigmentos.

As principais características dos fungos são (TORTORA et al., 2012):

- A hifa é a estrutura em destaque dos fungos filamentosos e o seu conjunto é denominado micélio. O micélio pode ser diferenciado em vegetativo (exerce as funções de assimilação de alimentos e fixação em substratos), e em reprodutivo (quando atua na reprodução dos fungos);
- Morfologicamente podem apresentar: a) Unicelular: Células arredondadas, ovóides ou alongadas, podendo se reproduzir por brotamento, cissiparidade ou por outro processo, e neste grupo tem-se as leveduras; b). Filamentoso: com ou sem septos, que são estruturas que dividem as hifas. As hifas podem se diferenciar em estruturas variadas, recebendo denominações diversas: rizóides, artrósporos anastomoses, etc.

Método

- Fazer a diluição 1:10 do composto (resíduo orgânico em processo de maturação – compostagem);
- Fazer a diluição seriada 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ;
- Inocular em Placa de Petri com Meio de Cultura Sabouraud uma alíquota de 0,1 ml, na parte central da placa;
- Incubar a 28°C por uma semana e paralelamente pelo mesmo período em temperatura ambiente (observar se há efeito do fotoperíodo);
- Proceder a técnica de microcultivo (tema de outra aula);

f) Decorrida uma semana do tópico acima, fazer a preparação da lâmina para observação das estruturas (esporos de reprodução, hifas).

Exercícios

- 1) Em quais placas foi observado o maior crescimento?
- 2) O meio de cultura utilizado foi apropriado? Justifique.
- 3) Fale dos tipos morfológicos de fungos.
- 4) Os fungos devem ser consumidos para fins da alimentação humana? Justifique. (obs.: pesquise sobre fungos alucinógenos)

Referências

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

USP. Universidade de São Paulo. Apostila das Aulas Práticas Microbiologia Básica para Farmácia. 2017. Disponível em: <

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4101474/mod_resource/content/1/Apostila-Praticas-BMM0160-DIURNO.pdf >. Acesso em 29 jun. 2018.

6.5 – REVISÃO GERAL A PARTIR DE NOVAS AULAS

O presente subitem tem por finalidade rever todos os conteúdos abordados até então de forma aplicada em diferentes práticas. Embora o Laboratório de Microbiologia Industrial seja assunto extremamente amplo, o domínio de técnicas como: segurança, identificação de vidrarias e equipamentos, visualização ao microscópio, identificação e preparo de meios de cultura, cultivo de microrganismos e por fim, os cuidados de assepsia que perpassam por todas as práticas, são técnicas fundamentais para domínio por parte dos que trabalham na área da Microbiologia.

Assim, espera-se que as atividades a seguir venham a ratificar as técnicas e os conhecimentos até então apresentados.

6.5.1 – Antibiograma

Objetivos

- * Conhecer os procedimentos para os testes de antibiograma;
- * Compreender a interpretar o resultado obtido no teste.

Duração: 4 aulas

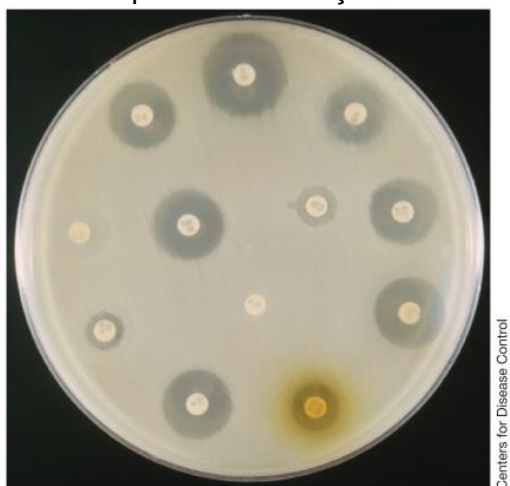
Antibiograma

O antibiograma é a “análise que indica a sensibilidade de um microrganismo isolado clinicamente aos antibióticos de uso corrente” (MADIGAN et al., 2016).

O procedimento padrão consiste em distribuir discos de papel de filtro sobre o meio de cultura, e que estes sejam embebidos com o antibiótico a ser utilizado, podendo simultaneamente testar vários tipos de antibióticos.

Quando o antibiótico tem efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, forma-se um halo no entorno da colônia, conforme mostra a figura 1. Para se determinar a concentração ideal a ser utilizada, são realizados vários testes com diferentes concentrações e/ou tipos de antibióticos. A menor concentração que resultou na inibição total do crescimento (observada na placa de Petri, em tubos de ensaio ou placa de microtubos) representa a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Figura 1 – Discos dispostos sobre a placa e a formação do Halo no entorno de colônias



Fonte: Madigan et al. (2016)

Outra opção para realização do Antibiograma é a fita *E-test*. A grande vantagem da fita *E-test* é a possibilidade de diferentes concentrações ao longo da fita.

Em casos clínicos, a escolha do antibiótico deve levar em consideração alguns preceitos, tais como:

- a) Paciente (idoso, criança...);
- b) O tipo de microrganismo;
- c) O sítio (bexiga, rins, cérebro...);
- d) O tipo de droga (antibiótico).

A escolha mais assertiva possível contribuirá para a reversão do quadro clínico do paciente.

Método

O procedimento metodológico laboratorial, principalmente para fins de pesquisa, utiliza microrganismos cultivados/preservados em laboratório e a partir de diferentes concentrações, realizam-se diferentes modelos experimentais (delineamentos). Para fins didáticos e devido a algumas limitações no Laboratório (leia sobre níveis de biossegurança), serão utilizadas placas de Petri preparadas previamente com microrganismos dispostos no solo e/ou outros ambientes.

Prática 1: teste com discos

a) Após a repicagem em placa de Petri, dispor os discos de antibióticos disponíveis em 5 pontos distintos, mantendo-os uniformemente distantes entre si e da parede da placa. Deixar os discos pressionados sobre o Meio de Cultura. OBS.: Espalhar sobre o ágar formando um tapete. Primeiro espalha na direção superior, depois na inferior e em seguida transversalmente, nas duas direções. Utilize a Alça de Drigalski ou o *Swab* também no contorno da placa;

b) Pode-se utilizar o gabarito para distribuir os discos de antibióticos sobre o meio de cultura;

c) Não permitir intervalo superior a 15 min. entre inocular a bactéria e inserir os discos;

d) Para disposição dos discos, usar a pinça para retirá-los do vidro (fazer flambagem da pinça);

e) Inocular e avaliar após 48h.

f) Medir o halo formado (ou não) no entorno dos discos.

Exercícios

- 1 – O que vem a ser CIM?
- 2 – O que vem a ser o Halo de Inibição? Como pode ser medido?
- 3 – Quais as diferenças entre os Discos e a Fita E-test para fins de Antibiograma?
- 4 – Além da eficiência a ser diagnosticada através de um antibiograma, do ponto de vista clínico quais são outros fatores a serem observados? Por que?

Referências

- BARONY, F. J. A. Acervo particular: Anotações de aula do curso de Especialização em Microbiologia Aplicada – ICB: Instituto de Ciências Biológicas. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.
- MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

6.5.2 – Bioprospecção de fungos

Objetivos

- * Conhecer os procedimentos para identificar novos microrganismos e/ou substâncias de interesse;
- * Compreender a aplicação da biotecnologia.

Duração: 4 aulas

A Bioprospecção: “tentativa e erro a partir da intuição...”

A bioprospecção consiste na busca sistemática por diferentes organismos, genes, compostos e processos produzidos por um ser vivo que apresentem potencial econômico e, eventualmente, possam levar ao desenvolvimento de um produto.

Os fungos são os microrganismos mais utilizados pela indústria para produção de diversos produtos como enzimas, antimicrobianos, biocombustíveis, corantes, pigmentos e extratos. Esses microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza podendo ser encontrados nos mais diversos habitats como solo, água, rochas, em regiões de nevadas e tropicais, além de estarem presentes também no interior de plantas, peixes, insetos e animais.

Um dos potenciais são os produtos gerados durante o metabolismo secundário dos fungos, que possuem grande interesse e aplicação nas áreas da medicina, indústria e agricultura. Diante disso, diversos estudos buscam conhecer estes produtos para sua aplicação biotecnológica.

Vale ressaltar a intuição do pesquisador, como no caso hipotético a seguir:

* Um pesquisador precisa aumentar o processo de degradação da matéria orgânica de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE). Aí ele pode chegar a seguinte especulação: Se em um ambiente rico em matéria orgânica (um lago ou pântano, por exemplo) existir uma espécie com resistente e com alto potencial de degradação, seria possível inserí-la em uma ETE? Ou ainda, seria possível extrair algum gene e modificar algum outro organismo? Ou ainda, neste ambiente (pântano) há grande produção de uma enzima que pode auxiliar em um determinado processo qualquer? A partir desta “intuição”, o pesquisador deve-se debruçar por uma longa jornada até obter a resposta. Assim acontece também com os remédios, por isto o controle sobre o uso dos antibióticos (pesquisar sobre resistência a antibióticos e dificuldades para obtenção de novas drogas).

Método

Os materiais utilizados são: tubo Falcon, espátula, bico de Bunsen, Meio de cultura Ágar Batata e alça de repicagem.

O passo a passo segue exposto em duas partes.

Parte 1:

a) Foram cultivados fungos em placa com ágar batata, por 15 dias, pois é quando atinge o metabolismo secundário;

b) Cortar o ágar com o fungo em pedados pequenos (fatiar o meio de cultura para aumentar a superfície de contato) e colocar dentro do tubo Falcon;

c) Usar etanol como solvente para captar as macromoléculas e micromoléculas, pois tem compostos secundários dentro da célula e no meio extracelular (figura 1). O etanol é empregado por ser de baixo custo e menos tóxico, além da capacidade de absorver um espectro maior de moléculas. A desvantagem é que não selecionam compostos, e por isto o filtrado pode estar “sujo/contaminado” por açúcares, ácido graxo...). O Dicloro Metano pode substituir o Etanol, mas tem custo muito mais elevado, é tóxico e a comercialização é regulada pela Polícia Federal. O ideal é deixar o Etanol em contato com o material do tubo Falcon por 4 a 5 dias;

d) Decorridos os dias acima, filtrar o material em filtro de papel para ficar livre de esporo, micélio e outras partes indesejáveis. Para filtrar, dobrar o papel de filtro ao meio por 3 vezes, até fazer um cone e inseri-lo no tubo falcon (figura 2);

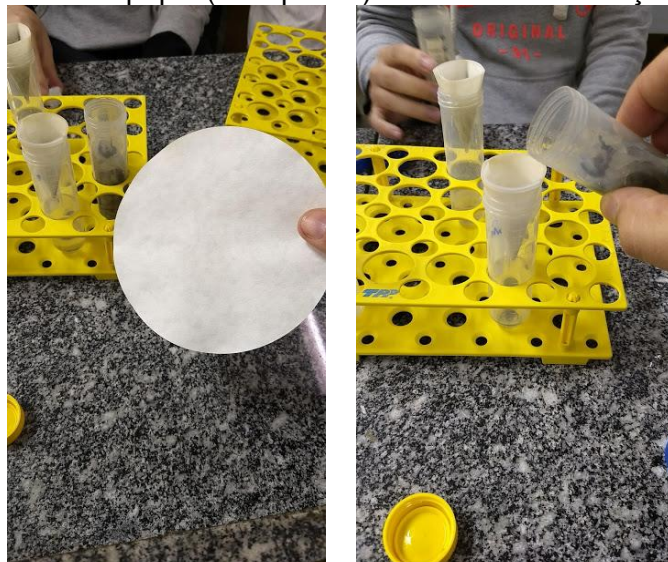
e) O líquido obtido deve ser reservado e o restante descartado. Obs.: O *Speed Vac* é o equipamento que acelera a remoção do etanol. É uma centrífuga à vácuo. Normalmente são necessários 2 dias de acompanhamento do equipamento no laboratório. O líquido tem que ser concentrado para poder ser usado no disco (do jeito que está na foto e se aplicado no disco, o efeito é do etanol e não da substância). **OBS.:** liofilizador é outro equipamento. **OBS.:** O material a ser obtido é semelhante ao da **figura 3**, mas no presente roteiro não será realizada a evaporação do etanol, de forma que o efeito do disco está mais pertinente ao Etanol do que a viabilidade da Bioprospecção.

Figura 1 – Corte do meio de cultura da placa de Petri e introdução no tubo Falcon com Etanol (à direita) e após 5 dias o material filtrado (à esquerda)



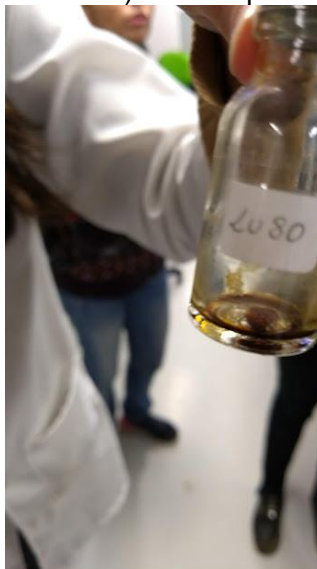
Fonte: Própria (2018)

Figura 2 – Filtro de papel (à esquerda) e momento da filtração (à direita)



Fonte: Própria (2018)

Figura 3 – Material (substância) obtida após a evaporação do etanol



Fonte: Própria (2018)

Parte 2:

- a) Aplicar uma alçada da cultura (inoculação) de um cultivo já pré-existente em salina e, posteriormente, 100 μ L da solução foi plaqueada em Meio Mueller Hinton (usar a Alça de Drigalski);
- b) Após esse procedimento, colocar 3 discos de papel filtro na placa e 1 disco de antibiótico (o Cloranfenicol, por exemplo);
- c) Preparar o extrato na concentração de 500 μ g/m (ou outra dentro das possibilidades analíticas do Laboratório) e fazer a diluição seriada, transferindo 100 μ L nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ;
- d) Ao final, utilizar 10 μ L de cada diluição sobre os 3 discos de papel de filtro para avaliar a ação do extrato como antibiótico (ATENTAR PARA A OBSERVAÇÃO DO FINAL DA INTRODUÇÃO SOBRE ESTE ASSUNTO). Vale destacar também que até a forma de extração de um produto bioativo pode alterar as suas propriedades de interesse;
- e) A distribuição dos discos na placa, bem como os resultados da ação das diferentes concentrações do extrato, pode ser observada após 2 dias.

Exercícios

- 1 – O que vem a ser metabolismo secundário dos fungos? Por que torna-se mais interessante nesta fase para fins de bioprospecção?

2 – Quais as principais dificuldades para encontrar novas substâncias e/ou microrganismos de interesse biotecnológico?

3 – O extrato encontrado apresentou atividade antimicrobiana? Justifique a partir das limitações elencadas.

Referências

BARONY, F. J. A. Acervo particular: Anotações de aula do curso de Especialização em Microbiologia Aplicada – ICB: Instituto de Ciências Biológicas. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

SACCARO JUNIOR, N. L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-753X2011000100013 >. Acesso: 17 Abr. 2019.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, p. 996–1004. 2002. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756208601501> >. Acesso em: 17 Abr. 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

6.5.3 – Teste de Rugai para identificação presuntiva de Enterobactérias

Objetivos

- * Conhecer um dos procedimentos bioquímicos para identificação clínica com resposta rápida;
- * Compreender a aplicação da biotecnologia.

Duração: 4 aulas

Princípio do teste de Rugai

O teste de Rugai pode ser empregado para fins de confirmação bioquímica do teste de Gram, entre outras aplicações e vantagens clínicas, como a celeridade

quanto a confirmação do agente microbiano, o que do ponto de vista da saúde é de extrema relevância.

O método é antigo na medicina, conforme citação a seguir. Rugai é um meio utilizado para identificação presuntiva de enterobactérias, víbrios e aeromonas. Este meio permite a leitura, num só tubo, das seguintes reações: Motilidade, Lisina descarboxilase, Fermentação de glicose e sacarose, Produção de gás-glicose, ácido sulfídrico, Indol, Urease e L-triptofanodesaminase (LTD) (Pessoa *et al.*, 1972).

Uma das microbiotas clássicas das bactérias gram-negativas é o trato urinário, o que é um fato normal do ponto de vista da saúde, embora a urina seja estéril e vem a adquirir microrganismos no contato com a pele no momento final da excreção. Assim, a urina coletada diretamente na bexiga apresenta concentração menor de micróbios comparativamente com a urina coletada ao final do canal da uretra.

Os principais microrganismos do na vagina são os Lactobacilos, que produz ácido láctico e mantem o pH na faixa de 3,8 a 4,5, inibindo o crescimento microbiano; e que além disso produz peróxido de hidrogênio, que também inibe o crescimento de outras bactérias.

Outros microrganismos como Estreptococos, vários anaeróbios e gram-negativos, e até o fungo leguriforme *Candida albicans* faz parte da microbiota norma de 10 a 25% das mulheres. Já a uretra masculina é estéril, exceto em caso de contaminação microbiana próxima à abertura externa.

Ainda assim, mesmo que no sistema urinário normalmente contenha poucos micróbios, há vulnerabilidade a infecções oportunistas que podem desencadear uma série de problemas. São as chamadas Infecções do Trato Urinário (ITU).

Normalmente a infecção tem origem em uma inflamação da uretra, ou uretrite. O grande perigo da infecção do trato urinário inferior é o fato delas poderem migrar para os ureteres e afetar os rins, causando pielonefrite. As principais doenças relacionadas Cistite, Pielonefrite e Leptospirose, como descritas no quadro 1 abaixo.

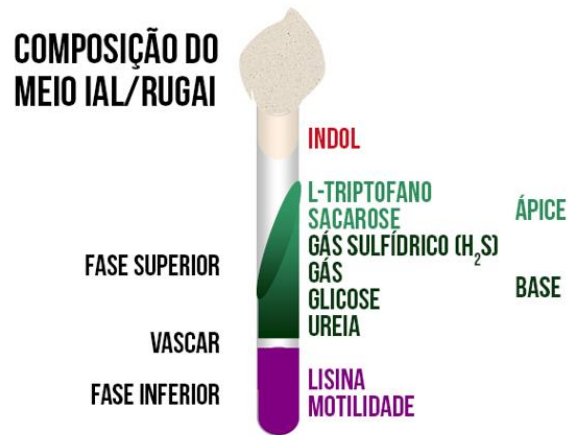
Quadro 1 – Dados gerais sobre ITU

Doença	Patógeno	Sintomas	Diagnóstico	Tratamento
Cistite (infecção da bexiga)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Dificuldade e dor ao urinar	>100 UFC/mL de patógenos potenciais e Teste LE+	Trimetropim-sulfametoxazol
Pielonefrite (infecção renal)	Principalmente <i>E. coli</i>	Febre, dor nas costas e nos flancos	>10 ⁴ UFC/mL e teste de LE+	Cefalosporina
Leptospirose (infecção renal)	<i>Leptospira interrogans</i>	Insuficiência renal com possível complicação, além de febre e dor muscular	Teste sorológico	Doxiciclina

Fonte: Tortora *et al.*, (2012). UFC: Unidade Formadora de Colônia. LE+: Esterase Leucocitária positivo, que é uma enzima produzida pelos neutrófilos, a qual indica infecção ativa

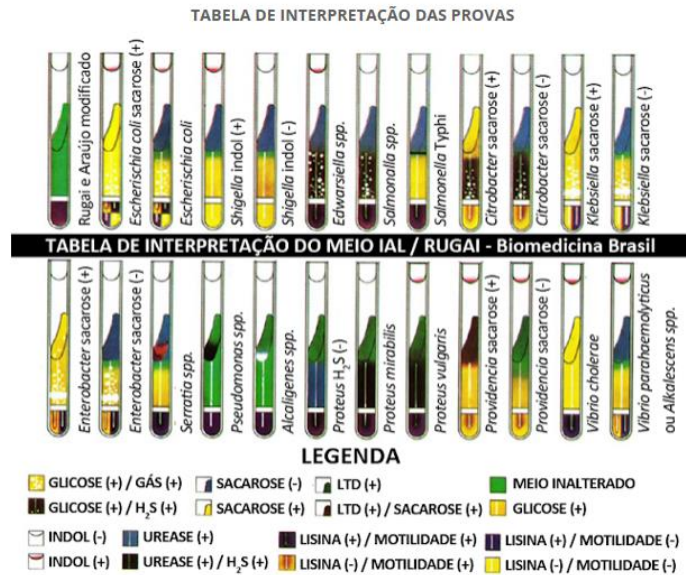
Características do Tubo de Rugai

Figura 1 – Composição do Tubo de Rugai



Fonte: Biomedicinabrasil.com (2019)

Figura 2 - Interpretação do resultado do tubo de Rugai



Fonte: Biomedicinabrasil.com (2019)

Método

Os materiais necessários são: Tubos Rugai; Alça de platina e Bico de Bunsen. Em aula anterior deve-se isolar cultura de Gram-negativa (em meio de cultura como o Ágar MacConkey).

O passo a passo deve seguir o exposto abaixo:

- A semeadura deverá ocorrer no meio Rugai com alça de platina chegando até o fundo do tubo, e ao retirar a mesma, realizar estrias na parte inclinada do meio;
- O tubo deve ser tapado com o seu próprio tampão de algodão e incubado em 37°C por 24 horas;
- Após a incubação proceder a identificação comparando o tubo com a tabela de interpretação das reações.

OBS.: informações completas sobre a metodologia e interpretação dos resultados devem ser estudadas nos links abaixo:

<http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/1369748cfd665ecc37.pdf>

<http://www.mbiolog.com.br/website/wp-content/uploads/2019/02/Bula-Meio-de-Rugai-e-Araujo-Modificado-por-Pessoa-e-Silva.pdf>

<http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/1369748cfd665ecc37.pdf>

Exercícios

1 – Quais as vantagens do ponto de vista clínico do Teste de Rugai (prova bioquímica)?

2 – O teste possibilita a comprovação de espécies gram-positivas e gram-negativas? Justifique.

Referências

BARONY, F. J. A. Acervo particular: Anotações de aula do curso de Especialização em Microbiologia Aplicada – ICB: Instituto de Ciências Biológicas. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012.

Pessoa Gil Vilat Alvares – Meios de Rugai e Lisina – motilidade combinados em um só tubo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 32. 1972. Disponível em: <

http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/70/rial_321-2_1972/n372.pdf >. Acesso: 18 Abr. 2019.

UNIDADE 7: EXPERIMENTOS COM ENZIMOLOGIA

7.1 – ESTUDO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ENZIMAS PRESENTES EM FRUTOS

Objetivos

- * Verificar o efeito das enzimas sobre a preservação dos alimentos;
- * Compreender a atuação das enzimas sobre a velocidade das reações químicas.

Duração: 2 aulas

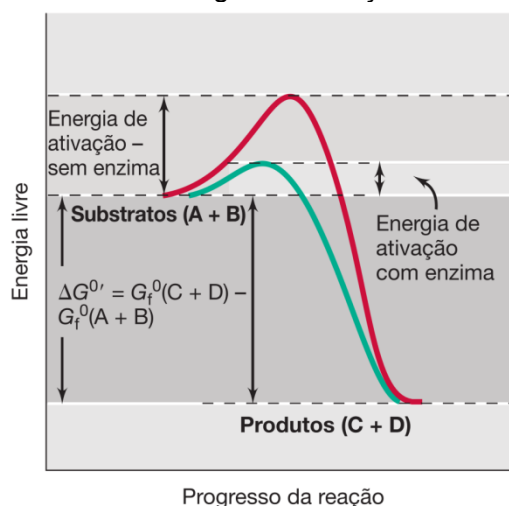
Breve conceituação

As proteínas são uma sequência de dezenas ou centenas de aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas.

As principais funções das proteínas são: função estrutural e enzimas. No que tange a atividade enzimática, ou catalizadores biológicos, consiste em acelerar a velocidade de uma reação química mediante a diminuição da energia de ativação da reação, mas com a peculiaridade de não ser consumida durante este processo.

O catalisador biológico corresponde a uma substância que diminui a energia de ativação de uma reação. Já energia de ativação é a quantidade de energia necessária para conduzir todas as moléculas de uma reação química a um estado reativo (ex. O_2 e H_2 dentro de uma garrafa lacrada não formaria considerável formação de água por falta de energia de ativação). O gráfico 1 abaixo ilustra os conceitos até então abordados (MADIGAN, et al., 2016):

Gráfico 1 – energia de ativação e catálise.



Fonte: Tortora et al., (2012).

Lembrete: a enzima combina com o reagente (substrato), formando um complexo enzima-substrato. Com a reação (formação do produto) este é liberado e a enzima retorna ao seu estado original, ou seja, em teoria todas as enzimas exigem uma ação reversível. Toda a reação pode durar milissegundos.

A porção do substrato onde a enzima se liga é chamado de sítio ativo. Todavia, toda esta atividade é diretamente afetada por fatores como pH e temperatura.

Algumas enzimas tem a capacidade de quebrar as cadeias proteicas, são as chamadas proteases. Aliás, o nome da enzima normalmente deriva do substrato sobre o qual ela atua (lipase, lactase, polimerase e assim por diante).

A protease é uma reação de hidrólise da cadeia polipeptídica (substrato), na qual aminoácidos e cadeias polipeptídicas menores podem ser gerados como produtos imediatos da reação.

“As enzimas proteolíticas são encontradas tanto em animais como em vegetais. Em animais, elas participam de importantes processos biológicos, entre os quais: a digestão proteica, a coagulação sanguínea, a morte celular e a diferenciação de tecidos. Sua atuação no processo digestivo, por exemplo, é essencial para o processo de absorção, pois hidrolisam as proteínas provenientes da alimentação para que seus aminoácidos (monômeros) possam ser absorvidos e reaproveitados pelo organismo. Do mesmo modo, vários processos proteolíticos são importantes durante o mecanismo invasivo de tumores, assim como ao longo do ciclo infeccioso de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Até mesmo as proteínas que constituem as nossas células são constantemente degradadas por complexos de proteases e, seus constituintes, reaproveitados pelo organismo” (LIMA et al., 2008).

“Em vegetais, as enzimas proteolíticas estão envolvidas nos processos de amadurecimento, de germinação, de diferenciação e morfogênese, de morte celular, de resposta de defesa de plantas a processos de estresse oxidativo, entre outros. Algumas enzimas envolvidas no amadurecimento de frutos, como a ficina (figo), a papaína (mamão) e a bromelina (abacaxi), podem ser extraídas em grandes quantidades e representam por isso uma significativa importância econômica” (LIMA et al., 2008).

“As enzimas proteolíticas possuem também uma vasta aplicação comercial/industrial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais e sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas. Na indústria alimentícia, as enzimas proteolíticas são largamente utilizadas para o amaciamento de carne e clarificação da cerveja — além do amaciamento de couro. Já na indústria farmacêutica, essas enzimas proteolíticas são empregadas em medicamentos para distúrbios de digestibilidade, tendo também ação antiinflamatória, antimucolítica e cicatrizante. Destaca-se ainda a utilização de enzimas proteolíticas em diversas receitas caseiras, sendo comum a utilização de leite de mamão e suco de abacaxi para amaciamento de carnes, além daquelas que recomendam o cozimento de carnes juntamente com pedaços dessas frutas. Não por acaso, o abacaxi é servido como sobremesa após uma refeição repleta de carnes, como no caso dos churrascos” (LIMA et al., 2008).

A gelatina usada neste experimento é um “produto comercial obtido a partir da hidrólise parcial do colágeno. O colágeno é uma proteína presente em tecidos conjuntivos, como os tendões e as cartilagens, na matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. Quando hidratada, a gelatina forma uma estrutura definida como gel” (LIMA et al., 2008).

Nesse experimento, portanto, foi estudada a atividade de enzimas proteolíticas presente em alguns frutos, utilizando a gelatina como modelo proteico de substrato. O princípio desse método consiste em monitorar a gelificação, processo que depende da integridade das cadeias poliméricas da proteína. Caso haja alguma fragmentação nas cadeias poliméricas, a formação do gel ficará comprometida, uma vez que o processo de gelificação, conforme o descrito acima, não ocorrerá.

Método

Os materiais para o experimento são: Abacaxi, Mamão, Morango, Amaciante para carnes, Peneira, Liquidificador (ou mixer), Microondas (pode ser substituído por aquecimento a lamparina), Geladeira (pode ser substituído por banho de gelo), Gelatina sem sabor, Tubos de ensaio, Pipetas volumétricas (pode ser substituído por seringas graduadas), Espátula, Faca, Bastão de vidro, Béquer 500 ml, Canudos plásticos (para refrigerantes), Caneta utilizada para marcar transparências de retroprojektor.

O passo a passo deve seguir o exposto abaixo:

1) Preparar o suco das frutas previamente picadas, utilizando o liquidificador e um pouco de água. O suco deve ser peneirado e reservado

2) Em seguida, dissolver aos poucos o pó da gelatina em 200mL de água fria e colocar essa solução no forno de micro-ondas por 30s, em potência alta

3) Preparar, então, a sequência de tubos de ensaios descrita na Tabela 1 abaixo. OBS.: controle negativo, produzido apenas com gelatina e água, já o controle positivo, feito com amaciante de carne que contém a enzima proteolítica papaína que hidrolisa a gelatina.

4) A ocorrência ou não da proteólise será avaliada por meio da gelificação, observada indiretamente mediante a viscosidade do meio, esta monitorada pela introdução de canudos plásticos nos tubos de ensaio. Para avaliar a viscosidade inicial do meio (antes da gelificação), introduz em cada tubo de ensaio um canudo plástico. Com uma caneta, anota-se no próprio tubo até onde os canudos se inseriram. Feito isso, retirar os canudos e deixar os tubos à temperatura ambiente por 10 min. Depois desse período, os tubos deverão ser colocados na geladeira onde permanecerão por mais 20 min para que ocorra a gelificação. Os tubos deverão ser preparados em duplicata.

5) Após esse período, deve-se avaliar a gelificação, colocando novamente os canudos plásticos dentro dos tubos de ensaio e anotar, com uma caneta, até onde estes se inseriram no interior dos tubos.

Tabela 1 – Delineamento do experimento

Tubo	Composição	Teste
1	10mL gelatina + 3mL de água	Controle negativo
2	10mL gelatina + 3mL de suco de mamão	Mamão
3	10mL gelatina + 3mL de suco de morango	Morango
4	10mL gelatina + 3mL de suco de abacaxi	Abacaxi
5	10mL gelatina + ponta de espátula para amaciante de carne dissolvida em 3 mL de água	Controle positivo

Exercícios

1) Quais as frutas utilizadas no experimento que apresentam enzima proteolítica? Como é possível chegar a essa conclusão?

2) Quais variações poderiam ser feitas nesse experimento para evidenciar ainda mais o efeito da enzima? (sugestão: relacione tais variações com os fatores que afetam atividade enzimática).

3) Qual seria o resultado esperado caso fosse utilizado suco de figo no experimento? Explique.

4) Além das descritas no texto, para quais outros fins essas enzimas proteolíticas poderiam também ser utilizadas?

5) Explique por que um fruto possui enzimas proteolíticas (relacionar com processo de amadurecimento).

6) CAIU NO ENEM. ENEM (2005) A obesidade, que nos países desenvolvidos já é tratada como epidemia, começa a preocupar especialistas no Brasil. Os últimos dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares, realizada entre 2002 e 2003 pelo IBGE, mostram que 40,6% da população brasileira estão acima do peso, ou seja, 38,8 milhões de adultos. Desse total, 10,5 milhões são considerados obesos. Várias são as dietas e os remédios que prometem um emagrecimento rápido e sem riscos. Há alguns anos foi lançado no mercado brasileiro um remédio de ação diferente dos demais, pois inibe a ação das lipases, enzimas que aceleram a reação de quebra de gorduras. Sem serem quebradas elas não são absorvidas pelo intestino, e parte das gorduras ingeridas é eliminada com as fezes. Como os lipídios são altamente energéticos, a pessoa tende a emagrecer. No entanto, esse remédio apresenta algumas contraindicações, pois a gordura não absorvida lubrifica o intestino, causando desagradáveis diarreias. Além do mais, podem ocorrer casos de baixa absorção de vitaminas lipossolúveis, como as A, D, E e K, pois

(A) essas vitaminas, por serem mais energéticas que as demais, precisam de lipídios para sua absorção. (B) a ausência dos lipídios torna a absorção dessas vitaminas desnecessária.

(C) essas vitaminas reagem com o remédio, transformando-se em outras vitaminas.

(D) as lipases também desdobram as vitaminas para que essas sejam absorvidas.

X (E) essas vitaminas se dissolvem nos lipídios e só são absorvidas junto com eles.

7) ENEM (2002). O milho verde recém-colhido tem um sabor adocicado. Já o milho verde comprado na feira, um ou dois dias depois de colhido, não é mais tão

doce, pois cerca de 50% dos carboidratos responsáveis pelo sabor adocicado são convertidos em amido nas primeiras 24 horas.

Para preservar o sabor do milho verde pode-se usar o seguinte procedimento em três etapas:

- 1- descascar e mergulhar as espigas em Água fervente por alguns minutos;
- 2- resfriá-las em Água corrente;
- 3- conservá-las na geladeira.

A preservação do sabor original do milho verde pelo procedimento descrito pode ser explicada pelo seguinte argumento:

- (A) O choque térmico converte as proteínas do milho em amido até a saturação; este ocupa o lugar do amido que seria formado espontaneamente.
- (B) A Água fervente e o resfriamento impermeabilizam a casca dos grãos de milho, impedindo a difusão de oxigênio e a oxidação da glicose.
- X (C) As enzimas responsáveis pela conversão desses carboidratos em amido são desnaturadas pelo tratamento com Água quente.
- (D) Microrganismos que, ao retirarem nutrientes dos grãos, convertem esses carboidratos em amido, são destruídos pelo aquecimento.
- (E) O aquecimento desidrata os grãos de milho, alterando o meio de dissolução onde ocorreria espontaneamente a transformação desses carboidratos em amido.

Referências

- CASTRO, R. J. S.; FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS POR MÚLTIPLAS EXTRAÇÕES E PRODUÇÃO DE PROTEASE DURANTE REINCUBAÇÃO DE FARELO DE TRIGO EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA. COBEQ – XVIII **Congresso de Engenharia Química**. 2010.
- LIMA, S. L. T.; *et al.* Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. **Revista Química Nova Escola**, nº 28. 2008.
- MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

7.2 – UM ESTUDO SOBRE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA

Objetivos

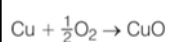
- * Verificar o efeito das enzimas sobre a preservação dos alimentos;
- * Entender o efeito de agentes inibidores da degradação dos alimentos;
- * Interpretar as informações básicas contidas em rótulos de alimentos.

Duração: 2 aulas

Breve introdução conceitual

“A reação de escurecimento em frutas, vegetais e sucos de frutas é um dos principais problemas na indústria de alimentos. A ação da polifenol oxidase, enzima que provoca a oxidação dos compostos fenólicos naturais presentes nos alimentos, causa a formação de pigmentos escuros” (CARVALHO *et al.*, 2005), normalmente provoca mudanças indesejáveis nos produtos, as chamadas propriedades organolépticas (percebidas pelos sentidos humanos, como a cor, o odor, o sabor), o que diminui a vida útil e valor de mercado.

As reações de oxidação-redução ou oxi-redução ocorrem nas mais diversas situações. As reações de oxi-redução envolvem perda e ganho de elétrons, de forma que as espécies que ganham elétrons sofrem redução e as que perdem, sofrem oxidação. A equação abaixo exemplifica um processo redox:



No caso, o cobre sofre oxidação, perdendo 2 elétrons que são transferidos ao oxigênio, que é então reduzido, formando óxido de cobre(II). O oxigênio é o agente oxidante da reação e o cobre, o agente redutor.

A oxidação enzimática de compostos fenólicos naturais na presença da enzima polifenol oxidase (PFO) e oxigênio molecular, formando quinona, leva ao escurecimento de frutas, legumes, tubérculos, entre outros. “As quinonas podem sofrer polimerização, formando pigmentos escuros insolúveis, denominados melaninas, ou podem reagir não enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, formando também as melaninas”, conforme citado por Carvalho *et al.*, 2005 apud Araújo, 1995. A reação de polimerização tende a unir espécies chamadas monoméricas, formando cadeias maiores, os polímeros. No

caso de escurecimento das frutas, a melanina é resultante do processo de polimerização das espécies monoméricas, como por exemplo, as quinonas.

Três (03) componentes participam da reação de escurecimento enzimático ocorra: enzima, substrato e oxigênio. Se o processo industrial, por exemplo, inibir a ação de um destes 3 componentes (por meio de agentes redutores, diminuição de temperatura ou redução de pH), a velocidade de reação diminui significativamente. Sendo o escurecimento enzimático uma reação oxidativa, ele pode ser retardado utilizando-se agentes químicos que sejam capazes de bloquear a reação (CARVALHO *et al.*, 2005).

A utilização de substâncias ácidas em tecidos vegetais é uma possibilidade para inibir esta reação. Os ácidos normalmente utilizados estão entre aqueles de ocorrência natural, como cítrico, ascórbico e málico. “O pH ótimo de atuação da PFO está entre 6 e 7, e abaixo de 3 não há nenhuma atividade enzimática. A vitamina C (ácido ascórbico) é utilizada para a prevenção do escurecimento em frutas e vegetais, pois na presença desse ácido, os compostos do tipo o-quinona são reduzidos para a forma fenólica” (CARVALHO *et al.*, 2005).

Para pensar: você observa o rótulo dos alimentos?

São propostas em estudo pela Anvisa (Agência de Vigilância Sanitária):

a) Classificação por letra (“a” a “e”) e em cores, no que refere ao grau do produto quanto a ser “saudável”;

b) Selo de advertência (sobre sódio, por exemplo);

c) Veja mais em: <https://saude.abril.com.br/alimentacao/o-rotulo-dos-alimentos-vai-mudar/> ou <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/alimentos/produtos/rotulagem>



OBS.: Sigla INS: International Number System

Método

Os materiais necessários são: Banana caturra; maçã; pêra; Prato; conta-gotas; faca e copos descartáveis; limão Taiti e Vitamina C (adquirida nas farmácias)

O passo a passo seguirá o exposto abaixo, sendo:

- 1) Dissolver a solução de vitamina C (ácido ascórbico), sendo: 1 g de vitamina C em 40 mL de água;
- 2) Preparar um suco de limão concentrado, ou seja, sem água;
- 3) Cortar as frutas em 3 fatias de cada fruta de mais ou menos 5 mm de espessura e colocar nos pratos. Usar uma das fatias como testemunha;
- 4) Nas outras duas fatias, adicionar com um conta-gotas o suco de limão ou a solução de vitamina C (até o total recobrimento da superfície), respectivamente;
- 5) Aguardar aproximadamente 20 minutos para a observação do fenômeno de escurecimento;
- 6) Explicar o processo de inibição enzimática ocorrido nas fatias das frutas contendo suco de limão e vitamina C e o escurecimento enzimático ocorrido na fatia sem as soluções dos antioxidantes.

Exercícios (já com as respostas)

1) Quais os principais efeitos deletérios no caso do escurecimento precoce dos alimentos?

Riscos de toxicidade, perda das características organolépticas, prejuízo econômico, em especial, para as indústrias.

2) Qual foi o efeito promovido pelo limão ou ácido ascórbico e que inibiu o escurecimento dos alimentos?

Em geral, sua ação dá-se pela redução do pH do tecido, diminuindo assim a velocidade da reação de escurecimento.

3) Quais as vantagens e as desvantagens de se utilizar antioxidantes (ou conservantes) nos alimentos?

A grande vantagem é a preservação do alimento, inibindo a sua depreciação, seja por carga microbológica ou por processo de oxi-redução. A desvantagem é que por vezes ocorre a alteração do sabor do produto (palmito, por exemplo, tem sabor bem distinto entre o *in natura* e o industrializado). Há casos onde apontam para riscos à saúde sob condições específicas, mas demandam novas pesquisas e estudos.

4) Por que, nas saladas de frutas, a banana e a maçã não escurecem tão rapidamente como acontece quando expostas ao ar?

Neste caso, pode ser em função das frutas ácidas, como o limão ou o abacaxi. Quando a maçã entra em contato com o ácido desses alimentos, o processo de oxidação é interrompido, afinal as enzimas de escurecimento são desativadas. O mesmo processo é válido para bananas, abacates e batatas.

5) Podemos dizer que um alimento com escurecimento está em fase de putrefação?

Putrefação é a ação de microrganismos que se proliferam e, em contato com o ar e a umidade se decompõem, ou seja, apodrecem o alimento.

6) Pode ocorrer o escurecimento não enzimático dos alimentos?

Normalmente envolvem açúcares ou compostos relacionados com açúcares.

Referências

ARAÚJO, M.A. **Química de alimentos. Teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1995. p. 247.

CARVALHO, L. C.; LUPETTI, K. O.; FILHO, O. F. Um estudo sobre oxidação enzimática e a prevenção do escurecimento de frutas no Ensino Médio. **Química Nova Escola**. 2005.

CLERICI, M. T. P. S.; et al. Escurecimento enzimático: uma aula prática. **Revista de Ensino de Bioquímica**. 2014.

MADIGAN, M. T.; et al. **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani et al. Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al.. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

7.3 – CATALISANDO A HIDRÓLISE DA UREIA EM URINA

Objetivos

* Ilustrar a hidrólise da ureia em urina catalisada pela urease extraída de sementes de melancia.

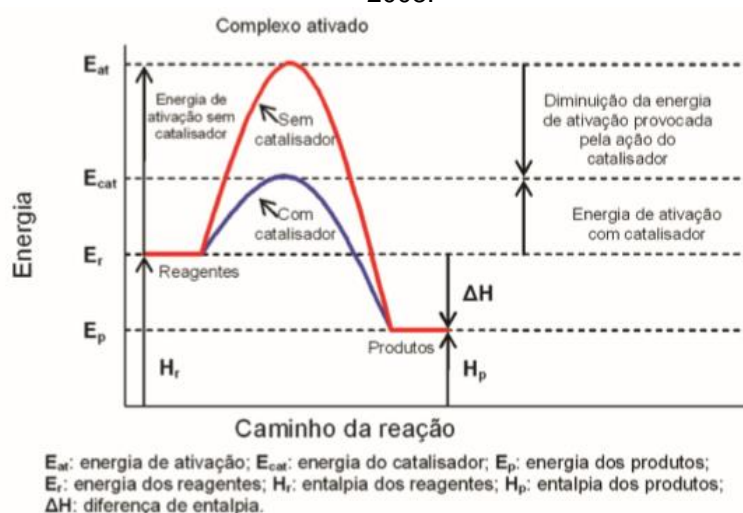
Duração: 2 aulas

Breve conceituação

Na natureza, continuamente há reações químicas ocorrendo ao nosso redor, com velocidades distintas. Nos vegetais, vários fatores podem intervir na velocidade das reações, como a presença dos catalizadores, a Atividade de Água (Aa ou Aw), temperatura, pH, concentração dos reagentes, superfície de contato e composição dos alimentos. A velocidade destas reações é objeto de estudo da Cinética Química

A cinética química é uma ciência que estuda a velocidade das reações químicas e os fatores que as influenciam. Especificamente quanto aos Catalisadores, estes são definidos como substâncias que aumentam a velocidade das reações químicas e não são consumidos durante o processo, sendo regenerados no final (figura 1) (ALMEIDA, *et al.*, 2008). A sua função é diminuir a energia necessária aos reagentes, de forma que a transformação química seja otimizada. Ou seja, a reação sem a presença do catalizador gasta mais energia de ativação. A energia de ativação é a energia mínima necessária para que os reagentes possam se transformar em produtos. Caso a reação ocorra sem a presença de um catalizador, a energia de ativação é maior, diminuindo assim a velocidade da reação.

Figura 1 – Efeito do uso dos catalisadores na velocidade das reações químicas. Fonte: Almeida et al., 2008.



Fonte: Tortora *et al.*, (2012).

OBS.: Entalpia: é a quantidade de energia que se encontra nas substâncias e que pode ser alterada mediante reações químicas.

Sendo catalisadores celulares poderosos, as enzimas são proteínas especializadas em acelerar reações biológicas e geralmente atuam especificamente em um dado substrato. O substrato liga-se à enzima num sítio especial desta, chamado sítio ativo, onde ocorre a reação enzimática. Essa é a região da enzima que possui certos aminoácidos que se ligam ao substrato por ligações não covalentes (Motta, 2006).

Urease

É uma enzima que em meio aquoso catalisa a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono (Figura 2). Algumas enzimas requerem um componente não proteico para sua atividade, denominado cofator. O cofator enzimático da urease é o íon metálico Ni_2 , logo, na sua presença, ele ativa o sítio da uréase.

A urease foi a primeira enzima isolada na forma cristalina, em 1926. Sua aplicabilidade na agricultura e na medicina são consagradas. Atualmente a urease é utilizada em procedimentos de diagnósticos clínicos, e na determinação de ureia em fluídos biológicos como urina e sangue. “A hidrólise da ureia, empregando essa enzima como biocatalisador, na temperatura de $20^{\circ}C$, é até 10^{14} vezes mais rápida que a hidrólise realizada em meio ácido a uma temperatura de $60^{\circ}C$ ” (SOUZA e FATIBELLO-FILHO, 2006, apud ALMEIDA et al., 2008). A urina humana é constituída de 2 a 5% em ureia e no organismo elimina os resíduos nitrogenados indesejáveis produzidos a partir das proteínas. Atualmente, a ureia é utilizada como suplemento na alimentação de animais, fertilizante agrícola, fabricação de plásticos, na indústria farmacêutica, e outros mais (Peruzzo e Canto, 1999).

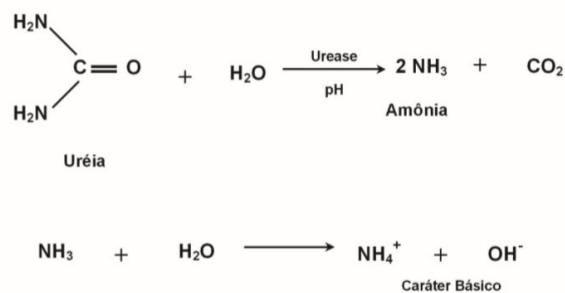


Figura 2 - Reação de decomposição da uréia e caráter básico da amônia em meio aquoso.

Fonte: Almeida et al., 2008.

Interferência do pH e da temperatura na velocidade das reações

As enzimas exercem o “ponto ótimo” de atuação em uma estreita faixa (figura 3). “O efeito do pH sobre a atividade enzimática se deve às variações no estado de ionização dos componentes do sistema e à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas, contêm inúmeros grupos ionizáveis e existem em diferentes estados de ionização” (ALMEIDA et al., 2008). Outros fatores também podem alterar a estabilidade das enzimas, como temperatura, força iônica, concentração de íons metálicos, concentração de substratos e contaminantes (os metais pesados são inibidores da urease), entre outros (BIOCLIN, 2006).

A velocidade da reação catalisada aumenta em resposta ao aumento da temperatura do sistema, pois ocorre o aumento da energia cinética das moléculas componentes do sistema, desde que a faixa de intervalo da temperatura seja compatível com a estrutura espacial da enzima, pois acima do “limite” tende a alterar as ligações que conservam a estrutura tridimensional da enzima, ou seja, após romper a ligação de H, a enzima assume conformação indefinida. A maioria das proteínas (incluindo as enzimas) é passível de desnaturação irreversível a temperaturas acima de 40°C ou 50°C, ou seja, bem acima do seu “ponto ótimo”.

Método

Os materiais necessários são: Estante para tubos de ensaio; 4 tubos de ensaio; Pipeta 5,0 mL; Extrato de repolho roxo; Sementes de melancia; Solução aquosa de ureia 1,0%; Urina humana (com termo de autorização dos pais); liquidificador; Filtro de papel; funil; Erlenmeyer; álcool etílico (comercial).

O passo a passo será conforme abaixo:

- a) Enumerar os 4 tubos de ensaio
- b) Adicionar aproximadamente 100 mL de água e cerca de 40 sementes de melancia em um liquidificador e triturar por 15 segundos. Filtrar a mistura e recolher a parte líquida
- c) Dividir a fração líquida em duas partes iguais e levar uma delas a fervura a 100°C por 1 minuto (inativação enzimática). Deixar em repouso para atingir a temperatura ambiente
- d) Para a obtenção do extrato de repolho roxo, triturar no liquidificador 3 folhas de repolho roxo picadas com aproximadamente 100 mL de álcool etílico comercial. Filtrar a mistura e utilizar o extrato alcoólico como indicador ácido-base. A extração

das antocianinas (pigmentos da classe dos flavonóides, responsáveis pelas cores azul, violeta, vermelho e rosa de flores e frutas e indicadores ácido-base naturais) pode inclusive ser realizada por imersão da folha de repolho roxo em etanol, seguido de repouso por 24 ou 48 horas (Terci e Rossi, 2002; Couto e cols., 1998).

e) Tubo 1 – No tubo de ensaio número 1, adicionar 1,0 mL de extrato de repolho roxo, 2,0 mL de urina recém-coletada e acrescentar 1,0 mL da fração líquida resultante da trituração de sementes de melancia em água (sem fervura). Agitar e observar a cada 10 minutos.

f) Tubo 2 – No tubo de ensaio número 2, adicionar 1,0 mL de extrato de repolho roxo, 2,0 mL de urina recém-coletada e acrescentar 1,0 mL do líquido resultante da trituração de sementes de melancia (fervido). Agitar e observar a cada 10 minutos

g) Repetir os procedimentos (acima) para os tubos 3 e 4, substituindo a urina pela solução de ureia a 1%.

Resultados esperados

TUBOS 1 e 3: A enzima urease (ativa), em meio aquoso e em contato com o substrato, decompõe a uréia em amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). A presença de CO_2 no meio reacional não reduz o pH a nível de acidez, como esperado, muito pelo contrário, o pH pode chegar a 11. Tal fato pode ocorrer porque a presença de amônia em meio aquoso se ioniza, disponibilizando para a solução íons hidroxilas (OH^-). Com isto, a cor esperada é verde (para estes tubos).

TUBOS 2 e 4: a enzima urease foi inativada pelo calor, portanto, a reação representada na Figura 1 pode ocorrer, contudo, em menor velocidade. Não havendo liberação da hidroxila (OH^-) em solução, o pH resultante não será alterado, portanto, não é esperado mudança na coloração do indicador utilizado.

Exercícios com respostas

1) O que vem a ser Atividade de água (Aa)?

2) Na natureza as reações químicas ocorrem a todo tempo, ao ponto de nem darmos o devido valor ou a percepção. A cinética química é a ciência responsável por estes estudos. Cite um exemplo de cada a seguir: reação rápida, reação lenta e reação moderada.

Explosão do dinamite (rápida), formação do petróleo (lenta) e deterioração dos alimentos por bactérias.

3) O que são catalisadores e quais outros fatores podem afetar a velocidade das reações?

4) Qual a faixa ótima de atuação da enzima da semente de melancia?

Um estudo sobre purificação de urease obtida de sementes de melancia verificou que essa enzima possui atividade ótima em pH 8,0 (Mohamed e cols., 1999).

5) A urina pode interferir negativamente no experimento?

É um substrato que apresenta diferenciados valores de pH e concentração de sais. A reação pode ser lenta caso o meio reacional interfira no sítio ativo enzimático, devido à ionização de aminoácidos na molécula que provoquem mudança da conformação da enzima.

6) Qual a finalidade de ferver a semente?

Inativação enzimática

7) Por que o pH e a temperatura afetam a velocidade das reações?

8) Pesquise: existe alguma relação dos conceitos deste experimento com o fenômeno da chuva ácida?

Referências

ALMEIDA, V. V.; et al. CATALISANDO A HIDRÓLISE DA UREIA EM URINA.

Revista Química Nova na Escola, n.º 28. 2008. Disponível em: <

<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc28/10-EEQ-5506.pdf> >. Acesso: 19 Abr. 2019.

MADIGAN, M. T.; et al. **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani et al. Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al.. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

UNIDADE 8: PREPARO E ANÁLISE DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

8.1 – PREPARO DE IOGURTE

Objetivos

- * Conhecer os benefícios do iogurte para a saúde;
- * Preparar iogurte a partir do inóculo de Kefir;
- * Visualizar estruturas bacterianas ao microscópio.

OBS.: não fazer uso dos produtos, pois não foram produzidos à luz da adequada vigilância sanitária.

Duração: 2 aulas (realizar preparação do iogurte antecipadamente)

Iogurte: algumas características e grupos microbianos de interesse

As bactérias são seres unicelulares, procariontes, que muitas vezes causam doenças, porém a maior parte das espécies é benéfica ao homem (diretamente na alimentação ou indiretamente a partir do nicho ecológico delas no meio ambiente). Entre as possíveis aplicações das bactérias, uma das mais consagradas é a fabricação de iogurte através dos lactobacilos que realizam o processo de fermentação.

Por falar em fermentação, em aula apresentamos alguns conceitos, entre eles: qualquer processo metabólico que libera energia e ocorra sob condições anaeróbicas; ou ainda, processo metabólico que libera energia de um açúcar ou outra molécula orgânica, que não requer oxigênio ou um sistema de transporte de elétrons e utiliza uma molécula orgânica como aceptor final de elétrons (TORTORA et al., 2012).

O iogurte em si é fruto da fermentação do leite. A versão natural não contém adição de sabor ou açúcar, mas a maioria é adocicada e possui alguma fruta, suco ou aromatizante.

Já a bebida láctea é feita do leite fermentado com até 51% de soro de leite e também pode ter adição de polpa ou suco de fruta. Porém, para ficar mais encorpado, com a consistência próxima a do iogurte, costuma ter amido de milho e um pouco de leite em pó.

O leite fermentado é produzido a partir da fermentação láctea provocada pela adição de lactobacilos vivos.

O iogurte é geralmente obtido pela fermentação do leite, por ação de duas bactérias – *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* – que transformam a lactose (o açúcar do leite) em ácido láctico. Como são adicionadas após o processo de pasteurização do leite, estas bactérias permanecem “vivas”, tornando os iogurtes verdadeiros “alimentos vivos”. Um dos aspectos positivos é o facto de estas duas bactérias conseguirem manter no organismo um meio ácido que impede o desenvolvimento de outros microrganismos e leveduras prejudiciais que podem causar infecções. Para além desta vantagem, as bactérias do iogurte ajudam o nosso corpo a reagir quando a flora intestinal se encontra fraca ou na presença de microrganismos prejudiciais. É de salientar que *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* são seres procariontes.

Os microrganismos de forma em geral, e não diferentemente com os lactobacilos do iogurte, se reproduzem em condições ambientais ótimas (temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes sob condições ótimas). Uma das opções é a aquisição de iogurte Natural para fins de inoculação no leite, assim, produzindo mais iogurte.

As bactérias benéficas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* são as responsáveis por tal “transformação”, uma vez que se reproduziram em razão das ótimas condições de temperatura (+40°C) e disponibilidade de alimento. Estas se alimentaram da lactose presente no leite, eliminando ácido láctico – responsável pela transformação propriamente dita e se reproduzindo assexuadamente.

Assim, o iogurte – ou a coalhada, dependendo do tipo de lactobacilo usado – possui as mesmas substâncias do leite, mas com uma proporção menor de lactose. Estes organismos, uma vez ingeridos, acidificam o intestino, impedindo a reprodução e superpopulação de bactérias nocivas e facilitam a absorção de nutrientes pelo órgão.

Outra opção consagrada para iogurte caseiro é com uso de Kefir. É uma associação simbiótica entre leveduras, bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas (UFRB, 2009). Trata-se de um alimento probiótico complexo produzido através da fermentação do leite por leveduras e bactérias.

“A receita mais pedida é como fazer iogurte de kefir, é muito simples você vai precisar apenas dos grãos de kefir e de 1 litro de leite, o sabor é opcional. Você pode fazer seu iogurte de kefir com frutas, com chocolate ou até mesmo apenas adoçar e consumir. o iogurte de kefir trás com ele todos os

benefícios dos grãos de kefir, ajuda a regular o intestino, aumenta a imunidade, ajuda a curar doenças inflamatórias no intestino etc...” (RECEITA NATUREBA, 2018).

O Kefir pode ter um gosto refrescante. Levemente azedo, com um aroma suave de fermento fresco semelhante a cerveja, assim como também pode ter um sabor forte efervescente natural e picante. O sabor depende da relação entre a quantidade de leite e grãos de Kefir e do tempo que se deixa fermentar.

“A fabricação do iogurte é controlada pelo processo de coalhadura. Basicamente, trata-se de fazer o leite estragar de uma maneira bastante específica. A partir daí, as proteínas do leite formam uma membrana em torno de cada partícula. Isso garante uma melhor distribuição da gordura através do iogurte conforme o leite coalha. Uma vez que o leite é resfriado a 37°C, ele está pronto para o processo que, para muitos, define um iogurte: a fermentação. Isso porque essa temperatura é ideal para a proliferação das duas mais importantes bactérias presentes no produto: *Lactobacillus delbrueckii* e *Streptococcus thermophilus*. Conforme elas aumentam, elas transformam a lactose em ácido láctico, diminuindo o pH do leite. As proteínas presentes começam a notar a diferença e seus grumos começam a se soltar. Quanto mais ácido o ambiente, mais elas se liberam e se unem a outras proteínas, formando uma espécie de rede, que por sua vez retém água e glóbulos de gordura. O leite virou iogurte (BBC, 2015).

Método

Os materiais necessários são: Microscópio óptico; Lâmina; Lamínula; Lamparina; Água; Álcool; Azul-de-metileno; *logurte*; *Óleo de imersão*.

Roteiro da prática 1

- a) Coloque uma porção de iogurte sobre a lâmina;
- b) Coloque uma gota de água e espalhe o material sobre a lâmina com muito cuidado (use a pipeta Pasteur);
- c) Coloque a lâmina sobre a lamparina a fim de que o material seque e fixe-se;
- d) Em seguida adicione uma gota de álcool e espere secar (aprox. 3 minutos);
- e) Para corar, coloque o azul-de-metileno, aguarde três minutos e lave a lâmina;
- f) Espere secar naturalmente. Após a secagem feche com uma lamínula;
- g) Use o óleo de imersão para objetiva de 100X no microscópio.

Roteiro da prática 2

1) Aquecer o leite até uma temperatura de aproximadamente 40° (temperatura em que **não** se tenha mais condições de colocar na panela de leite o dedo LIMPO e permanecer por mais de 3 segundos);

2) Após o aquecimento, colocar o leite em vasilhas apropriadas e, em cada uma delas, inserir o iogurte (ou lactobacilos). Tapá-las e enrolar sobre cada uma delas um pano e deixá-la em repouso até o outro dia.

Roteiro da prática 3

a) Adquira os grãos de Kefir e certifique que eles estão reativados;

b) Tenha em mãos, um pote de vidro esterilizado, uma colher de plástico também esterilizada, 1 litro de leite integral em temperatura ambiente, um pano limpo e um plástico;

c) Coloque os grãos de kefir dentro do pote de vidro, acrescente a quantidade de leite certa a quantidade de grãos (para cada 1 colher de sopa usa-se 500ml de leite, para cada 1 colher de chá usa-se 250ml de leite). Tampe com o pano, coloque o plástico e leve para fermentar por 24 horas em um lugar escuro e fechadinho;

d) Depois das 24 horas, coe seu kefir passando por uma peneira também de plástico já esterilizado, passe o liquido para um jarro e leve a geladeira. Esterilize o pote de vidro e volte os grãos de kefir fazendo o mesmo processo;

e) O líquido que foi retirado já é o iogurte, agora é só deixar gelar. Bata com frutas, suco ou o que preferir na hora de consumir, ele pode durar até 7 dias na geladeira.

Dica: Seu iogurte pode ser fermentado por no mínimo 12 horas e por no máximo 36 horas. Adicione frutas, açúcar mascavo e granola para cortar a acidez. Há outras dicas em sites de confiança.

Para descongelar o Kefir siga as instruções disponíveis no link abaixo:

<https://receitanatureba.com/como-descongelar-o-kefir-ativar-o-quefir-de-maneira-facil/>

Exercícios

1) As bactérias são classificadas de acordo com a sua forma, por exemplo: bacilo (formato de bastão), coco (forma esférica), espirilo (forma espiralada), vibrião

(forma de vírgula), entre outras. Durante a prática foi possível identificar algum destes arranjos?

- 2) A qual grupo taxonômico pertence as células observadas?
- 3) O que vem a ser fermentação?
- 4) Quais as diferenças entre iogurte, bebida láctea e leite fermentado?

Referências

BBC. A química por trás do iogurte. Reportagem no site. Disponível em: <

https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/08/150825_vert_fut_segredos_iogurte_ml>. Acesso: 19 Abr. 2019.

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

NASCIMENTO, R. P.; *et al.* **Microbiologia Industrial: bioprocessos (volume 1)**.

Bernardo Dias Ribeiro *et al.* (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier.

674p. 2018.

RECEITA NATUREBA. Kefir: como fazer iogurte. Reportagem no site. Disponível em: < <https://receitanatureba.com/kefir-como-fazer-iogurte/> >. Acesso: 19 Abr. 2019.

RIBEIRO, B. D.; *et al.* **Microbiologia Industrial (volume 2)**. Bernardo Dias Ribeiro

et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 470p. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo

Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

UFRB – Universidade Federal do Recôncavo Baiano. Disponível em: <

<https://www2.ufrb.edu.br/kefirdoreconcavo/images/Weschenfelder.pdf>>. Acesso: 19 Abr. 2019.

8.2 – PREPARO DE DERIVADOS LÁCTEOS

Objetivos

- * Conhecer os procedimentos para produção de queijo;
- * Conhecer os tipos de queijos mais comercializados;
- * Conhecer a classificação de um produto lácteo.

OBS.: não fazer uso dos produtos, pois não foram produzidos à luz da adequada vigilância sanitária.

Duração: 2 aulas

Derivados lácteos no dia a dia

O leite é o produto da secreção da glândula mamária dos mamíferos. O leite e o mel são as únicas substâncias na natureza destinadas, exclusivamente, a servir de alimentos. O leite não específico mais utilizado na alimentação humana é o leite de vaca, seguindo-se o de cabra.

“Os produtos lácteos são aqueles que possuem o leite como principal elemento em sua composição. Entre estes se enquadram o leite fluído pasteurizado ou esterilizado, o leite desnatado, a manteiga, o creme de leite, os queijos, a ricota, o requeijão, o iogurte, os doces e as bebidas lácteas. A multiplicação de micro-organismos e a rancidez oxidativa são as principais causas da deterioração da qualidade dos produtos lácteos. O tipo de deterioração depende das características específicas de cada produto. Por exemplo, os queijos duros - com baixo teor de umidade - são normalmente afetados pelo crescimento de fungos, enquanto que os queijos brandos ou cremosos - com alto teor de umidade - são mais suscetíveis às fermentações e rancidez” (EMBRAPA, 2018).

O site “ciência do leite” (2018) menciona a classificação para os produtos lácteos, conforme abaixo:

a) Os ingredientes lácteos devem representar no mínimo 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa do total de ingredientes (obrigatórios ou matéria-prima) do produto;

b) Composto Lácteo ou Composto Lácteo sem Adição: é o produto em cuja elaboração sejam empregados exclusivamente produtos ou substâncias alimentícias lácteas. O produto final deve apresentar 100% (cem por cento) massa/massa (m/m) de ingredientes lácteos;

c) Composto Lácteo com Adição: é o produto em cuja elaboração sejam empregados produtos ou substâncias alimentícias não lácteas. O produto final deve apresentar no mínimo 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) de ingredientes lácteos (BRASIL, 2007).

Coalho é o agente que vai promover a coagulação do leite, formando a massa do queijo. Esse método é denominado “coagulação enzimática”, pois o coagulante é formado por uma enzima, que é uma proteína com propriedades específicas.

“As proteínas do soro são extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo. Durante décadas, essa parte do leite era dispensada pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70, os cientistas passaram a estudar as propriedades dessas proteínas. As proteínas do soro do leite, também conhecidas como *whey protein*, são extraídas durante o processo de fabricação do queijo” (HARAGUCHI et al., (2008).

O soro do leite é, em linhas gerais, a parte líquida do leite que se separa da caseína, um tipo de proteína encontrada no alimento. Durante esse processo de “separação”, o soro reúne nutrientes importantes como o cálcio, fósforo, potássio, carboidratos, selênio e vitamina B12 e zinco.

Alguns derivados do soro do leite são: ricota, bebida láctea fermentada e doce do soro do leite.

Quais são os tipos de queijo?

O “portal do queijo” (2018) apresenta a seguinte classificação abaixo.

Primeiramente, o que é Cura?

O termo cura diz respeito ao ponto de maturação do queijo. Após a sua fabricação, o queijo fica em “descanso”, que é o chamado momento da maturação. Eles são colocados em estantes de madeira e virados para realizarem o processo em ambos os lados. É aqui que o queijo adquire as suas características próprias, incluindo as locais, que diferenciam o queijo de região para região.

Meia Cura

O queijo Meia Cura é aquele queijo nem fresco nem curado. Seu período de maturação não é bem definido, pode variar entre uma e cinco semanas, assim como a sua temperatura que varia de 10°C até a temperatura ambiente. É um queijo produzido com leite cru, mas pode ser encontrado com leite pasteurizado.

Curado

O queijo curado é um queijo mais seco e mais firme, massa mais ou menos firme, casca amarelada e de sabor levemente ácido. Seu processo de maturação fortalece a intensidade do seu sabor e melhora a sua conservação.

Queijo Canastra ou da Canastra

Queijo Canastra não é o queijo produzido em todo o estado de Minas Gerais como muita gente pensa! O Canastra é aquele queijo produzido na região da Serra da Canastra. Ele é feito com leite cru, um “primo” distante do queijo da Serra da Estrela, de Portugal. É indicado consumi-lo com pelo menos uma semana de maturação. Com o passar dos dias, esse queijo adquire uma cor dourada e vai enrijecendo de fora para dentro. É um bom acompanhante da cerveja gelada, cachaça ou vinho tinto. É importante conservá-lo em local fresco e ventilado. Para que a maturação ocorra de forma certa, o queijo deve descansar sobre um prato ou uma tábua de madeira e ser virado uma vez por dia. Não é recomendado deixa-lo em sacos plásticos ou na geladeira, pois o seu sabor é alterado.

Queijo Minas

O termo queijo Minas se refere a qualquer queijo produzido em Minas Gerais, independente do local de fabricação ou do processo de maturação. No mercado, por exemplo, é possível encontrar o **queijo minas artesanal, minas padrão e queijo minas frescal**.

O **Queijo Minas Artesanal** é o queijo produzido nas fazendas mineiras, produzido através do leite cru e é uma herança histórica de Minas Gerais. Ele passa pelo processo de maturação que varia de região para região. São os queijos produzidos nas sete microrregiões produtoras de Minas.

A tradição do queijo Minas artesanal utiliza o leite produzido na própria fazenda, além de matérias-primas locais, exceto o sal.

O **Queijo Minas Padrão** é elaborado seguindo uma receita mineira de forma industrial. Sua umidade é menor e geralmente é vendido a meia cura, o que possibilita um período de validade maior.

Já o **Queijo Minas Frescal** é um queijo fresco, possui sabor menos intenso, massa crua e delicada e não passa pelo processo de maturação. Deve ser consumido em até 10 dias após a fabricação. A sua produção se concentra na Zona sul e Zona da mata mineira.

O tempo de maturação (descanso) de cada queijo altera a estrutura e cor da casca. Quanto mais maturado, mais amarelada e mais consistente fica. Como vocês podem perceber, o queijo Minas tem muitas variações e nomenclaturas, mas algumas características são gerais, como o formato cilíndrico, bordas retas e faces planas, textura lisa que pode ou não apresentar pequenos buracos.

Preparo do leite para coagulação

Nessa etapa, são feitos os procedimentos necessários para coagular a caseína (proteína do leite), dando origem à massa do queijo (coalhada). Para a coagulação do queijo, é preciso adicionar ao leite os ingredientes descritos a seguir.

Fermento é uma cultura láctica, selecionada, que deve ser adicionada ao leite para a fabricação de queijos. O fermento possui as seguintes finalidades:

- Produzir ácido láctico e, conseqüentemente, reduzir o crescimento de microrganismos indesejáveis, o que pode ocorrer pela diminuição do pH;
- Desenvolver pequena acidez, que aumentará o poder de coagulação do coalho;
- Melhorar a consistência do coágulo e auxiliar na etapa de retirada do soro.

Para a fabricação de queijo minas frescal é utilizado fermento composto pelas bactérias (microrganismos) *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*. Esses microrganismos são classificados como mesófilos, ou seja, crescem bem na faixa de temperatura entre 30°C e 37°C. A quantidade a ser adicionada é de 1% a 1,5% em relação à quantidade de leite utilizada na fabricação dos queijos.

Método

Os materiais necessários são: Coalho. 2 L de leite pasteurizado. Sal. Forma para prensar. Prato. Colher de sopa. (ver demais itens no experimento 2).

Experimento 1: Queijo

2,5 L de leite e coalho de acordo com o fabricante.

Passo a passo:

- Colocar o leite para aquecer a 35°C
- Colocar o coalho de acordo com a indicação do fabricante

- Agitar bastante e deixar a massa em repouso a 35°C por 50 a 70 min.
- Uma vez obtida a coalhada fazer cortes formando cubos de 1,5 cm
- Deixar em repouso por 5 minutos
- Suspende a coalhada
- Colocar sal na massa
- Colocar a massa na forma
- Salgar a superfície do queijo
- Após 30 minutos virar o queijo
- Conservá-lo em geladeira

Parâmetros a serem analisados: Rendimento da coalhada e do soro; quantidade de leite utilizado e o peso do queijo obtido; medir o soro em proveta.

Experimento 2: Maionese de Leite

Ingredientes:

1 xícara de chá de leite integral bem gelado; Suco de 1 limão; 1 colher de chá de sal; ¼ de cebola pequena; Óleo de soja gelado; Cheiro verde ou outros temperos a gosto.

Modo de preparo: Liquidificar todos os ingredientes e ir acrescentando óleo até obter consistência e volume desejados.

Exercícios

- 1) Qual a função do coalho para produção de queijo?
- 2) Quais são os principais tipos de queijo? Cite-os. Elenque 3 itens que os diferenciam, em linhas gerais.
- 3) Alguns microrganismos podem comprometer a qualidade do leite e derivados mesmo após a pasteurização, pois são formadores de esporos. Cite duas medidas que podem ser observadas para evitar este problema.
- 4) Qual a composição do soro? Ele tem finalidade para produção de algum outro derivado do leite?
- 5) Como você classificaria o leite que acabou de produzir na aula de hoje?
- 6) Queijo com furos demasiados após o corte pode ser qual tipo de indicativo?

7) **Exercício com resposta.** Mundo educação (2018). O leite é uma mistura de diferentes substâncias (proteínas, carboidratos, vitaminas, gordura, sais minerais e água) e, por meio da análise de sua composição e propriedades, é possível verificar a qualidade do leite. Uma análise simples é a medida da densidade, que deve estar entre os valores 1,028 e 1,034 g/L. Com base nisso, julgue os itens a seguir e assinale a única opção que está correta:

- a) No caso de o leite ser adulterado com a adição de água ($d_{\text{água}} = 1,0 \text{ g/cm}^3$), sua densidade será maior que os valores-padrão.
- b) No caso de o leite ser adulterado por retirada de gordura (utilizada na produção de manteiga), sua densidade será menor que os valores-padrão.
- c) A densidade do leite adulterado pode se situar entre os valores permitidos.
- d) A densidade da gordura do leite é aproximadamente $0,927 \text{ g/cm}^3$, e a do leite desnatado é cerca de $1,035 \text{ g/cm}^3$. Assim, um leite com 3,0% de gordura deverá ter uma densidade menor que o de um com 4,5% de gordura.
- e) A densidade da água oxigenada (solução de peróxido de hidrogênio) é de $1,45 \text{ g/cm}^3$. No entanto, escândalos surgiram em torno de uma suposta adição de água oxigenada no leite. Nesse caso, a densidade do leite adulterado será menor que a dos valores-padrão.

Resposta correta: Alternativa “C”.

- a) Incorreta. Visto que a densidade da água é menor que a do leite, a sua adição ao leite deve diminuir a densidade.
- b) Incorreta. A densidade será maior porque a gordura tem menor densidade entre as substâncias do leite, e a sua retirada implica o aumento da porcentagem das substâncias mais densas, aumentando a densidade do leite que sobrou.
- c) Correta. Se ao leite for adicionada uma substância menos densa que ele, como a água, e houver a retirada de substâncias menos densas, como a gordura, esses dois frascos podem se compensar e a densidade do leite permanecer dentro dos valores permitidos.
- d) Incorreta. Visto que a densidade da gordura do leite é menor que a densidade do leite, um leite que tiver mais gordura terá menor densidade.
- e) Incorreta. Visto que a densidade da água oxigenada é maior que a do leite, a sua adição ao leite deve aumentar a densidade.

Referências

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Disponível em: < <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/INSTRUÇÃO-NORMATIVA-Nº-28-DE-12-DE-JUNHO-DE-2007.pdf> >. Acesso: 18 Abr. 2019.

Ciência do Leite. Composto Lácteo não é leite em pó. Reportagem do site. Disponível em: < <https://cienciadoleite.com.br/noticia/230/composto-lacteo-nao-e-leite-em-po> >. Acesso: 18 Abr. 2019.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Queijo Minas Frescal. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11884/2/00076200.pdf> >. Acesso: 19 Abr. 2019.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição – PUC Campinas**. 2008. Disponível em: < <http://www.vitafor.com.br/OLD/upload/artigos/wheyprotein.PDF> >. Acesso: 11 Out. 2018.

NASCIMENTO, R. P.; et al. **Microbiologia Industrial: bioprocessos (volume 1)**. Bernardo Dias Ribeiro et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 674p. 2018.

RIBEIRO, B. D.; et al. **Microbiologia Industrial (volume 2)**. Bernardo Dias Ribeiro et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 470p. 2018.

PORTAL DO QUEIJO. Reportagem no site. Disponível em: < <https://portaldoqueijo.com.br/> >. Acesso: 18 Abr. 2019.

8.3 – INVESTIGANDO COMPONENTES PRESENTES NO LEITE

Objetivos

- * Apresentar os principais microrganismos que podem estar presentes;
- * Apresentar os principais problemas decorrentes da contaminação microbiológica;
- * Conhecer os tipos de pasteurização.

Duração: 2 aulas

O leite e seus componentes

O leite é um alimento amplamente empregado na dieta alimentar humana, todavia, há necessidade de cuidados especiais ao longo da cadeia produtiva, pois é uma fonte de microrganismos e por sua vez comprometimento da saúde.

O leite quando esgotado do animal já apresenta uma rica microbiota presente no corpo do animal, além do risco da contaminação externa (água, solo, esterco e outros).

Por ser um alimento rico em nutrientes, como proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e sais minerais, a presença de microrganismos contaminantes compromete as características físico-químicos e organolépticos, além de problemas econômicos e de saúde pública.

Os microrganismos no leite podem ser classificados em 3 grupos (PRONATEC, 2013):

1) Microrganismos benéficos para a indústria de laticínios: necessários para as fermentações e decompor proteínas (necessárias na fabricação de queijos).

2) Microrganismos prejudiciais para a indústria: podem desencadear a coagulação do leite, modificação da cor e sabor, decomposição de proteínas etc.

3) Microrganismos causadores de enfermidades (patógenos): podem causar doença no homem. A inoculação pode ocorrer ao longo de toda a cadeia produtiva (produção, transporte, distribuição...), podendo ser provocado por bactérias, vírus e parasitos.

A carga microbiana do leite cru diz muito da sua qualidade e a contaminação ocorre principalmente na ordenha, seja devido infecção no animal, no homem ou falta de higiene.

O leite ao sair do úbere possui uma flora variável de 500 a 1000 microrganismos/ml, podendo atingir 10000, representada por *Micrococcus* e *Bacillus* não patogênicos (PRONATEC, 2013).

Os microrganismos presentes no leite cru são os mesmos encontrados no úbere, na pele, no ambiente da ordenha como um todo e até nas tubulações.

Na fase de ordenha e conservação, são encontrados principalmente os seguintes gêneros abaixo:

Enterococcus, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e outros.

A flora microbiana (ou simplesmente denominada microbiota) é classificada em homofermentativa e heterofermentativa. A classificação decorre dos produtos finais da fermentação. As bactérias que fermentam a lactose dando como produto principal ácido láctico e pequena quantidade de outros produtos como ácido acético, CO₂, e outras substâncias voláteis são denominados de heterofermentativas.

a) Flora normal homofermentativa:

Streptococcus cremoris

Streptococcus lactis

Lactobacillus bulgaricus

Lactobacillus acidophilus

b) Flora normal heterofermentativa:

Streptococcus diacetylactis

Streptococcus thermophilus

Leuconostoc dextranicus

Leuconostoc citrovarum

Tratamento do leite

a) Filtração: eliminar eventuais detritos e resíduos que venham a atingir o leite no momento da ordenha;

a) Resfriamento: o leite *in natura* (no momento da ordenha) tem temperatura de 35°C e é favorável à multiplicação da flora microbiana. O resfriamento a uma temperatura de 3°C a 5°C evita a acidificação

c) Pasteurização do leite: elimina germes patogênicos e preserva as características nutritivas. Bactérias como *Micobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetti* são destruídas (são usadas como referência para definição da temperatura de pasteurização). A pasteurização também mata leveduras, fungos filamentosos, bactérias gram-negativas, e muitas das gram-positivas, sobrevivendo, entretanto, as termodúricas (resistentes a pasteurização). “Os microrganismos não esporulados que resistem à pasteurização do leite são geralmente dos gêneros *Streptococcus* e

Lactobacillus” (PRONATEC, 2013). Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são termófilos de maior importância em alimentos.

Tipos de pasteurização

- 1) Rápida: aquecimento do leite a 72°C a 73°C, e manutenção dessa temperatura por 15 segundos, seguido de resfriamento brusco a 32°C ou 5°C.
- 2) Lenta: consiste no aquecimento do leite a 65°C e manutenção dessa temperatura por 30 minutos, seguido de resfriamento a 32°C. Alguns microrganismos termoestáveis sobrevivem, mas não se desenvolvem se o leite é conservado sob refrigeração a temperaturas entre 5°C a 10°C.

A eficácia da pasteurização está na dependência do número inicial de bactérias existentes no leite cru e do tipo de bactérias contaminantes. Bactérias esporuladas e termodúricas podem sobreviver, e especula-se que 5% da população total sobreviverão ao processo de pasteurização (Montes).

O leite é classificado em tipo “A”, “B” e “C” em função da carga microbiana e dos cuidados higiênicos. A tabela 1 ilustra as características:

Tabela 1 – Características do tipo de leite (Fonte: PRONATEC, 2013)

Tipo de Leite	Concentração máxima de microrganismos por mL	Características
Tipo A	500/mL	Não existe contato manual em nenhuma etapa da produção, sendo 100% mecânica e enviada diretamente para a pasteurização e envase
Tipo B	40.000/mL	A ordenha pode ser mecânica ou manual. O leite aguarda por até 48h em ambiente refrigerado para passar pelo processo de pasteurização
Tipo C	100.000/mL	Tem as mesmas características do tipo B, porém com uma única diferença: ele não passa por um processo de refrigeração após a sua coleta

Os leites UHT (*ultra high temperature*), que passam por um processo de superaquecimento para eliminar sua carga bacteriana, para depois serem envasados em caixinhas. Também são chamados de leite longa vida.

Alterações microbiológicas no leite

Sabores e odores do leite. O aparecimento de sabores e de odores estranhos no leite e derivados é decorrente da multiplicação de microrganismos. A origem do problema pode estar relacionada à ordenha, resistência na pasteurização e até contaminação após o processo. “O sabor e odor ácidos são devidos a reações de fermentação de açúcares por bactérias presentes nesses produtos, como por exemplo, a fermentação láctica e a fermentação butírica. O sabor amargo é decorrente da presença de peptídeos devido à proteólise, enquanto que o sabor e o aroma de ranço são devidos à oxidação ou hidrólise da gordura do leite e derivados” (PRONATEC, 2013).

O quadro 1 abaixo apresenta as características organolépticas envolvidas e os microrganismos associados.

Quadro 1 – Características organolépticas (PRONATEC, 2013)

Característica	Microrganismo associado
Aroma de caramelo ou queimado, semelhante ao de leite cozido	Provocado por cepas de <i>Lactobacillus lactis</i> var. <i>maltigenes</i>
Odor de estábulo	desenvolvimento de <i>Enterobacter</i>
Odor de peixe	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Odor de batata	<i>Pseudomonas mucidolens</i>

Outras características a serem observadas no leite:

- Alterações na cor;
- Rancidez;
- Alterações na viscosidade;
- Produção de gás.

Método

Passo a passo:

a) I – Em um vidro de relógio ou pires, coloque duas pequenas amostras de sulfato de cobre anidro (desidratado, sem água), distantes uma da outra. A seguir pingue uma gota de água em uma delas e uma gota de leite na outra. 1 – O que você observou? Baseado nisso, você pode afirmar que a água é um dos componentes do leite? Por quê?

b) II – A 100 mL de leite aquecido (50 °C a 60 °C) contido no copo, adicione vinagre gota a gota e agite com bastão de vidro até observar coagulação. Atenção! Pode ser que o vinagre tenha perdido suas propriedades ácidas. Para verificar isso, use a fita de indicação do pH. 2 - O que você observou depois da adição de vinagre ao leite?

c) III - Após a adição do vinagre ao leite, “coe” a mistura em um béquer ou copo, usando funil e um pedaço de gaze ou papel de filtro. 3 - O que você separou na gaze?

d) IV - Aqueça o líquido (obtido no item III) em um béquer, usando uma lamparina, por alguns minutos e observe. 4 – O que você observou?

e) V - Filtre novamente o conteúdo do béquer em outro usando papel e, em seguida, aqueça-o até a secura. 5- O que restou no béquer? À qual classe de substâncias você acha que estas pertencem?

Exercícios

- 1) Qual a diferença entre iogurte e leite fermentado?
- 2) Qual a análise crítica que você faz sobre os 3 tipos de leite?
- 3) Quais são os 2 tipos de pasteurização e o que os diferencia?

Referências

MADIGAN, M. T.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* Editora Artmed, 14ªed. 1006 p. 2016.

NASCIMENTO, R. P.; *et al.* **Microbiologia Industrial: bioprocessos (volume 1)**. Bernardo Dias Ribeiro *et al.* (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 674p. 2018.

RIBEIRO, B. D.; *et al.* **Microbiologia Industrial (volume 2)**. Bernardo Dias Ribeiro *et al.* (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 470p. 2018.

PRONATEC. **Derivados do Leite**. Apostila. 2013. Disponível em: <
http://pronatec.ifpr.edu.br/wp-content/uploads/2012/07/Derivados_do_Leite.pdf >.

Acesso: 18 Abr. 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

8.4 – TESTES DE QUALIDADE DO LEITE

Objetivos

- * Apresentar os principais testes de qualidade do leite;
- * Conhecer algumas das possíveis fraudes que podem ocorrer na cadeia produtiva do leite.

Duração: 2 aulas

O leite e a qualidade

O leite é conceito como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, conforme preconiza a legislação brasileira (BRASIL, 2002).

Como já estudamos em aulas anteriores, o leite é um alimento amplamente utilizado pelo homem, seja in natura ou para produção de derivados lácteos. O leite é um alimento com ampla variedade de nutrientes em sua composição e benéficos à deita humana, mas também é uma fonte de contaminação por microrganismos, sobretudo, quando indevidamente produzido (da ordenha ao produto final).

A depreciação do leite pode ocorrer por interferência ou não de microrganismos, mas no caso deste último, pode ser que ocorra contaminação sem a percepção do paladar humano, o que agrava a situação, pois pode comprometer a saúde do indivíduo.

O leite pode habitar uma vasta comunidade microbiana, sob diferentes nichos, inclusive psicotróficas, mesófilas e termófilas. Diversos artigos abordam sobre a alta concentração de microrganismos no leite (ANDRETTA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Para regulamentar este produto aqui no Brasil, a Instrução Normativa nº 51 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece critérios e parâmetros da qualidade do leite, desde a ordenha até o transporte, bem como os requisitos microbiológicos e físico-químicos, como contagem de células somáticas (CCS) e limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos (BRASIL, 2002).

Vários parâmetros são monitorados com o intuito de evitar fraudes, o que pode ocorrer ao longo de toda a cadeia produtiva do leite. Além dos parâmetros abaixo (passo a passo), outros como presença de formol, sangue, urina, pus,

mastite, peroxidase, fazem parte dos testes rápidos para verificação da qualidade do leite.

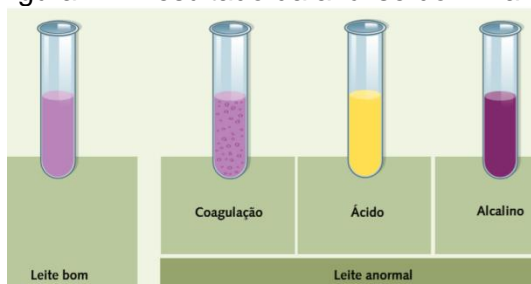
Método

Os experimentos abaixo foram obtidos a partir de Lima e Penna (2012), trabalho este realizado pela Emater- MG (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural).

Experimento 1 – Teste do Alizarol, que tem por finalidade selecionar o leite que será submetido ao aquecimento.

- Misturar 2 ml (partes iguais) do leite e Alizarol em um tubo de ensaio
- Use tubo de ensaio, estante, Alizarol e pipeta de 5 mL.
- Resultado:
 - Leite bom: vermelho-lilás sem coagulação
 - Leite anormal: conforme figura 1 abaixo.

Figura 1 – Resultado da análise do Alizarol



Fonte: Lima e Penna (2012)

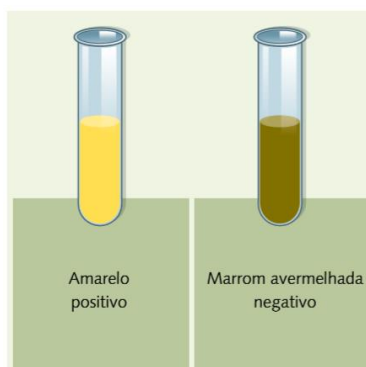
Experimento 2 - acidez Dornic (°d). “O desenvolvimento da acidez do leite deve-se, principalmente, à degradação da lactose (carboidrato presente no leite) em ácido láctico, pela ação de microrganismos. O resultado obtido na análise é um indicador das condições de higiene e de refrigeração do leite, desde a ordenha até a chegada da matéria-prima à indústria” (LIMA e PENNA, 2012). A análise baseia-se na titulação dos compostos de caráter ácido contra uma solução alcalina de concentração conhecida: hidróxido de sódio 0,11 mol/l (solução Dornic): ou hidróxido de sódio 0,1 mol/l. A utilização do indicador de pH fenolftaleína determina o término da titulação pela viragem para coloração rósea estável por pelo menos 30 segundos.

- Pipetar 10 ml de leite para o bécher, erlenmeyer ou tubo de ensaio e pingar 2 a 4 gotas de fenolftaleína, titulando contra a solução Dornic.
- Resultado: O ponto final da titulação será levemente róseo, e a leitura será feita em °D (graus Dornic). Cada 0,1 ml de solução Dornic = 1°D
- Para expressar o resultado em % de ácido láctico, usar a seguinte fórmula: % al = °D/100
- Consulte o site da Embrapa para interpretação dos resultados: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_194_21720039_246.html

Experimento 3 – Cloretos. O nitrato de prata reage com os cloretos, em presença de cromato de potássio como indicador.

- Em tubo de ensaio colocar 10 ml de leite
- Adicionar 0,5 ml de solução de cromato de potássio 5% e 4,5 ml de solução de nitrato de prata 0,1 mol/l
- Agitar
- Interpretação do resultado:
 - Positivo: presença de cloretos em quantidades superiores à faixa normal: coloração amarela.
 - Negativo (teor normal de cloretos – 0,08 a 0,1%): coloração marrom-avermelhada, conforme figura 2 abaixo.

Figura 2 – resultado de análise de cloretos



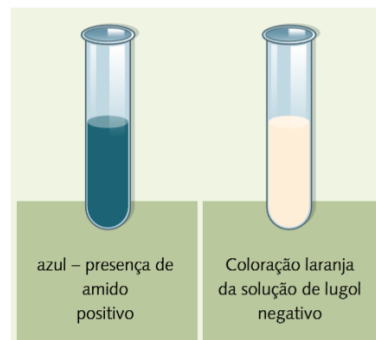
Fonte: Lima e Penna (2012)

Experimento 4 – Amido. Quando a amostra é aquecida, a molécula de amido tem uma cadeia dilatada e ocorre a formação de um composto azul de adsorção do iodo (solução de lugol), com o desenvolvimento da coloração característica.

- Transferir 10 ml de leite para o tubo de ensaio

- Aquecer até ebulição em banho-maria e deixar por 5 minutos
- Esfriar em água corrente
- Adicionar 2 gotas de solução de lugol
- Observar a coloração produzida
- Interpretação do resultado:
 - Positivo: presença de amido, coloração azul.
 - Negativo: coloração laranja da solução de lugol (ver figura 3 abaixo)

Figura 3 – Resultado para análise de amido



Fonte: Lima e Penna (2012)

Experimento 5 – pH. É uma propriedade com muitas aplicações tecnológicas, como, por exemplo, determinar o grau de fermentação de produtos.

- Colocar 100 ml de leite em um béquer, com temperatura de 20 a 25°C.
- Fazer a leitura após a estabilização do aparelho.
- Após solução analisada, deve-se enxaguá-lo com água destilada e secar com papel absorvente de cima para baixo, bem levemente.
- Compare o resultado com a fita de pH (tornassol).

Exercícios

- 1) Cite 5 parâmetros utilizados para verificar a qualidade do leite.
- 2) Algum dos parâmetros acima (do experimento 1 ao 5) pode estar associado a atividade microbiana? Justifique.
- 3) Poderíamos especular alguma vantagem dos procedimentos acima (experimentos 1 ao 5) em relação a equipamentos mais sofisticados em laboratório?
- 4) Enumere 5 cuidados que devem ocorrer ao longo da cadeia produtiva do leite para evitar contaminação microbiológica.

Referências

ANDRETTA, M.; *et al.* Teteira como fonte de contaminação de microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes em sistema de ordenha mecanizado balde ao pé, na região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 14, n. 3. 2016. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/35027> >. Acesso: 22 Out. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. 2002. Disponível em: < <http://www.leitebrasil.org.br/legislacao.htm> >. Acesso: 22 Out. 2018.

LIMA, M. S.; PENNA, L. P. C. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos**. Belo Horizonte: Emater-MG, 2012. 68p.

NASCIMENTO, R. P.; *et al.* **Microbiologia Industrial: bioprocessos (volume 1)**. Bernardo Dias Ribeiro *et al.* (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 674p. 2018.

OLIVEIRA, G. C. *et al.* Qualidade higiênica de amostras oriundas de latões de leite de conjunto de pequenas propriedades de agricultura familiar em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3. 2016.

RIBEIRO, B. D.; *et al.* **Microbiologia Industrial (volume 2)**. Bernardo Dias Ribeiro *et al.* (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 470p. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

8.5 – ANÁLISE QUALITATIVA DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS COM ÍON CÚPRICO

Objetivos

* Demonstrar qualitativamente a presença de proteínas nos alimentos a partir da reação do íon cúprico.

Duração: 2 aulas

O íon cúprico na rotina da indústria de alimentos

Um dos métodos mais empregados para a quantificação (bem como qualitativa) de proteínas nos alimentos é por meio da redução de íons de cobre bivalente. Este trabalho propõe um experimento simples, baseado na reação clássica de complexação entre cobre (II) e biureto, adaptada para detecção de proteínas em alimentos. Este procedimento também pode ser adaptado para quantificação de açúcares (ALMEIDA et al., 2013; ARGANDOÑA et al., 2017).

“As proteínas se caracterizam por ser o grupo mais abundante de macromoléculas, encontradas dentro e fora das células, e de importância vital aos seres vivos. Suas funções vão desde catálise de reações químicas (enzimas), transporte de outras moléculas, transmissão de impulsos nervosos, proteção imunitária e até mesmo função hormonal, entre outras” (ALMEIDA et al., 2013). No corpo humano ela se transforma em mais de 100.000 tipos, totalizando 15% do peso do corpo.

“As unidades constituintes fundamentais das proteínas são os aminoácidos. Estes, por sua vez, são moléculas orgânicas que possuem ligadas ao mesmo átomo de carbono (denominado de carbono α) um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral R (característica para cada aminoácido). Essa cadeia é o que difere os aminoácidos em estrutura, tamanho e propriedade físico-química” (FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006).

Nos alimentos as proteínas são encontradas em carne, peixe, ovo, leite e derivados, entre outros. A maior parte dos vegetais é pobre em proteínas, exceto algumas leguminosas como soja, amendoim e feijão.

Por exemplo, a cada 100g de alimento, a carne bobina tem 27,0g de proteína, o ovo 13,0g, o feijão 6,0 g e o arroz 2,0g.

Uma das características do Ion cúprico ou chamado compostos de coordenação, é que são capazes de absorver radiação, resultando em compostos coloridos.

O diagnóstico sobre proteínas tem relevância em várias áreas como, por exemplo, em análises clínicas, favorecendo o tratamento de certas doenças relacionadas a quantidade de proteínas nos fluídos biológicos.

Uma reação geral que caracteriza ligações peptídicas é chamada reação de biureto, nome dado à estrutura originada a partir da decomposição da ureia, quando esta é submetida a uma temperatura de aproximadamente 180°C e que fornece resultado positivo nesse teste (Petkowicz, 2007).

“O método de biureto tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios como soro, urina, alimentos. Apesar de ser rápido, utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absortividade específica para diferentes proteínas, esse método apresenta a desvantagem de baixa sensibilidade, pois os métodos que envolvem a reação de biureto requerem alta concentração de proteína na amostra como destaca o trabalho” de Zaia et al. (1998), citado por ALMEIDA et al., 2013.

A presente aula prática é um experimento simples, que utiliza materiais de fácil aquisição e ilustra uma reação qualitativa para detecção de proteínas em alimentos, tendo como resultado o surgimento de uma coloração violeta (indicativo de proteínas) devido à formação do composto de coordenação formado a partir da interação entre proteínas e o íon Cu^{2+} .

Método

Materiais: Hidróxido de sódio (solução 20 %); sulfato de cobre (solução 0,25 mol/L); água; sal; açúcar; amido de milho; clara de ovo; extrato (caldo) de carne fresca; leite; suco ou leite de soja; conta-gotas; espátula; tubos de ensaio; e estante para tubos.

Passo a passo, conforme Almeida *et al.* (2012):

1) Solução de referência (padrão de cor do reagente): em um tubo de ensaio, adicionar 20 gotas de água, 20 gotas de solução de NaOH e 5 gotas de solução de CuSO_4 . Misturar bem os reagentes e observar a coloração;

2) Alimentos em pó: tomar uma pitada da amostra (amido de milho, açúcar, sal) e dissolvê-la em 15-20 gotas de água. Em seguida, adicionar 20 gotas de solução de NaOH e 5 gotas de solução de CuSO_4 . Agitar bem a mistura e observar a coloração;

3) Alimentos líquidos: no caso de leite, suco ou leite de soja e extrato (caldo) de carne fresca (deixar um pequeno pedaço de carne vermelha em água, 50 mL, por alguns minutos e separar o caldo), adicionar 10 gotas da amostra em um tubo de ensaio e, a este, 10 gotas de água. Misturar 20 gotas de solução de NaOH e 5 gotas de solução de CuSO_4 . Agitar e aguardar;

4) Colorações em diferentes concentrações de extrato de carne: separar 4 tubos de ensaio. Ao primeiro, adicionar 3 gotas de extrato de carne; ao segundo, 8 gotas; ao terceiro, 13 gotas; e ao quarto, 23 gotas. Sobre cada amostra, adicionar 20 gotas de solução de NaOH e 5 gotas de solução de CuSO_4 . Completar o volume com água (aproximadamente 10 mL). Agitar e aguardar. Transferir alíquotas de cada solução para tubos limpos, evitando a transferência de sólidos formados.

Exercícios

1) Cite uma vantagem e uma desvantagem em relação ao método de biureto.

2) Há limite para detecção da concentração de proteínas a partir deste método?

3) Quais as funções das proteínas no corpo humano?

4) A conformação tridimensional da proteína é extremamente importante para sua atividade funcional. A desnaturação proteica – por exemplo, por altas temperaturas – é um processo que desfaz as interações moleculares que mantêm a conformação tridimensional da proteína, afetando assim sua função. O ato de fritar ou cozinhar um ovo, por exemplo, afeta a conformação da proteína albumina encontrada na sua clara, que fica esbranquiçada após esse processo e, mesmo com a diminuição da temperatura, ela não volta ao estado normal. Se você utilizar o método do biureto para detectar as proteínas da clara de um ovo cru e de um cozido, encontrará resultados semelhantes? Explique.

5) Reflita: Qual a importância industrial desta aula, sobretudo, para o consumidor?

OBS.: sulfato de cobre e o hidróxido de sódio coram a ligação peptídica. Com o rompimento desta, a coloração some.

Referências

- ALMEIDA, V. V.; et al. Análise Qualitativa de Proteínas em Alimentos Por Meio de Reação de Complexação do Íon Cúprico. **Revista QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**. Vol. 35, Nº 1, p. 34-40. 2013. Disponível em: <
http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc35_1/06-EEQ-79-11.pdf >. Acesso: 15 Abr. 2019.
- ARGANDOÑA , E. J. S.; et al. **Roteiro de aulas práticas da disciplina de análise de alimentos**. Eliana Janet Sanjinez Argandoña ... [et al.]. Dourados, MS: Ed. UFGD, 2017. (Coleção Cadernos Acadêmicos). 105p. Disponível em: <
<http://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/EDITORA/Roteiro%20de%20aulas%20práticas.pdf> >. Acesso: 15 Abr. 2019.
- FRANCISCO Jr., W.E.F. e FRANCISCO, W. Proteínas: hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. **Química Nova na Escola**, n. 24, p. 12-16, 2006. Disponível em: <
http://www.ciencia.iao.usp.br/tudo/exibir.php?midia=qne&cod=_conceitoscientificosemde_6 >. Acesso em: 15 Abr. 2019.
- NASCIMENTO, R. P.; et al. **Microbiologia Industrial: bioprocessos (volume 1)**. Bernardo Dias Ribeiro et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 674p. 2018.
- RIBEIRO, B. D.; et al. **Microbiologia Industrial (volume 2)**. Bernardo Dias Ribeiro et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 470p. 2018.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.*. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

UNIDADE 9: FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

9.1 – A QUÍMICA DA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

9.1.1 – Produção de vinho

Objetivos

* Observar o processo de fermentação para produção do vinho a partir de diferentes espécies de uvas;

* Observar os cuidados sanitários se realizado em escala industrial.

OBS.: não fazer uso dos produtos, pois além da menoridade, não foram produzidos à luz da adequada vigilância sanitária.

Duração: 4 aulas

Características da fermentação do vinho

Conforme Tortora *et al.* (2012), fermentar apresenta diferentes conceitos e características, sendo:

- a) Qualquer deterioração do alimento por microrganismo;
- b) Qualquer processo que produz bebidas alcoólicas ou laticínios acidificados;
- c) Qualquer processo microbiano em grande escala ocorrendo com ou sem ar (definição comumente utilizada na indústria);
- d) Qualquer processo metabólico liberando energia que ocorra sob condições anaeróbias (é um conceito mais científico);
- e) Qualquer processo metabólico que libera energia de um açúcar ou outra molécula orgânica, que não requer oxigênio ou um sistema de transporte de elétrons e utiliza uma molécula orgânica como acceptor final de elétrons (conceito adotado do livro dos autores);
- f) Produz apenas um (01) ou dois (02) moléculas de ATP, isto porque grande parte da energia original da glicose permanece nas ligações químicas dos produtos orgânicos finais, como ácido láctico ou o etanol;
- g) Não requer oxigênio, mas por vezes pode ocorrer na presença dele.

A produção de vinho é um costume antigo e remota de 6000 a.C. Os vinhos tintos são feitos a partir de uvas escuras, como *merlot* e *cabernet sauvignon*, enquanto as uvas verdes, como *chardonnay* e *moscatel*, dão origem aos brancos. O

rendimento é variável entre as vinícolas, mas estima-se que para obter 1 L de vinho é preciso 1,5 Kg de uva.

Isso é o que afirma a lei n.º 7678/88, no artigo 3º: "vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura", existindo regulamentação para toda a cadeia produtiva (BRASIL, 1988; BRASIL, 2014).

Saccharomyces cerevisiae é o microrganismo mais comum no processo de fermentação do vinho, tanto que também é usada para a produção de cerveja e pães. Isso ocorre porque ela tem uma resistência maior ao álcool e ao SO₂ (dióxido de enxofre).

O microrganismo que predomina na fermentação alcoólica é o *Sacharomyces cerevisiae*. Esta levedura apresenta características peculiares, tais como: tolerar as condições como alta concentração inicial de açúcar, acidez elevada, variações na temperatura, disponibilidade de nutrientes e, principalmente, por resistir aos teores crescentes de etanol. Esses microrganismos sintetizam determinadas substâncias que os protegem de compostos tóxicos gerados durante o processo de fermentação e do álcool produzido no meio. É por essa razão que muito dificilmente o *Saccharomyces cerevisiae* vem a ser predada por outros microrganismos (RESENDE *et al.*, 2010).

As etapas de produção do vinho são basicamente:

- a) Colheita,
- b) Esmagamento;
- c) Prensagem;
- d) Fermentação (processo fermentativo é iniciado imediatamente após a adição de 20 g/hL de levedura seca ativa - *Saccharomyces cerevisiae* -, onde se dá a fermentação alcoólica seguida da fermentação malolática, ou seja, a transformação do ácido málico em láctico, o que ocorre entre 2 a 10 dias). Na fermentação os açúcares glicose e frutose são transformados em etanol;
- e) Trásfega (passar o vinho de um recipiente para o outro após decantar material sólido na fase de fermentação);
- f) Clarificação e estabilização (estabilização microbiológica evita que novas fermentações aconteçam depois do vinho engarrafado);
- g) Amadurecimento (em barril ou tanque de aço);

h) E por fim, engarrafamento (vedação com a rolha de cortiça tem como principal função proteger o vinho das contaminações microbianas e das oxidações - provém da casca de carvalho - *Quercus suber L.*).

Curiosidades

- a) Enólogo é o profissional que estuda o vinho;
- b) O suco de uva pode naturalmente transformar em vinho (mas não palatável, normalmente) em função da fermentação natural de microrganismos presentes, bem como associado a outros fatores, como cristais presente no suco;
- c) Há também o vinho sem álcool, onde o processo de fermentação ocorre, mas o álcool é removido em outra fase do processo;
- d) O vinho é elaborado pela fermentação da uva, já o suco de uva é obtido após o cozimento até evaporar a água da uva;
- e) Oxidação do etanol torna o vinho impróprio;
- f) A safra de vinho é variável em função do tipo de solo, clima, condições climáticas e outros fatores;
- g) Você sabe a diferença entre “safra” e “lote” na indústria? Lote é aquele produto passível de repetição na linha de produção, já safra é aquele produto “único”. Lembre-se, entre um ano e outro ocorre alteração no regime de chuva, temperatura, condições do solo e outras (diferentes toneis de reservatório), que por sua vez alteram as propriedades da uva. Assim, fala-se em safra;
- h) Mosto é todo líquido açucarado apto a fermentar.

Como vimos os açúcares presentes no suco de uva sofreram fermentação e se transformaram em etanol, originando o vinho.

Caso ocorra o contato do vinho com o ar durante a fase de fermentação, pode ocorrer a oxidação do etanol pelos microrganismos existentes no vinho, visto que ele não é uma bebida destilada, e também pela ação do oxigênio presente no ar.

Toda reação de oxidação de um álcool primário forma um aldeído, que em seguida sofre oxidação e forma um ácido carboxílico. Assim, no caso do etanol presente no vinho, sua oxidação originaria o etanal e, posteriormente, o ácido etanoico (ácido acético), que é o vinagre. Lembremos que os açúcares glicose e frutose presentes no suco de uva são transformados em etanol durante o seu processo de fermentação, sendo:



Fermento biológico e fermento químico (REVISTA SUPERINTERESSANTE, 2016)

“O fermento biológico é composto por fungos microscópicos vivos, enquanto o químico (ou em pó) é feito à base de bicarbonato de potássio. A forma como eles agem é bastante distinta. Os fungos do fermento vivo se alimentam da glicose da farinha de trigo: sua digestão produz, entre outras substâncias, as bolhas de gás carbônico (ou dióxido de carbono) que fazem a massa crescer. Já no fermento químico, o mesmo gás é obtido em reações do bicarbonato de sódio com algum ácido. Na fabricação do fermento em pó, o bicarbonato é misturado a substâncias que se tornam ácidas ao entrar em contato com líquidos ou quando são aquecidas. O pó já começa a reagir na hora de bater o bolo e, na maioria das vezes, continua a fazê-lo enquanto o bolo está no forno. Já os fungos do fermento biológico demoram um pouco a fazer seu trabalho e morrem no calor do forno. Assim, em receitas com fermentação biológica, como pães e pizzas, é necessário esperar a massa crescer antes de começar a assá-la”.

Método

Os materiais necessários para esta prática são: 1Kg de uva, garrafão de 5 L, 50 cm de mangueira transparente, elástico, liquidificador, 0,5g de fermento biológico, coador, água e rolha.

Passo a passo (BRASIL ESCOLA, 2018):

1. Faça um suco de uva colocando as uvas para bater no liquidificador;
2. Transfira o suco com o bagaço para o garrafão de vidro;
3. Adicione o fermento biológico ao suco;
4. Faça um furo na rolha e passe a mangueira;
5. Tampe a boca do garrafão com a rolha;
6. Coloque um pouco de água dentro da mangueira, sem deixar cair no suco, e dobre com o elástico, conforme mostrado abaixo na figura 1:

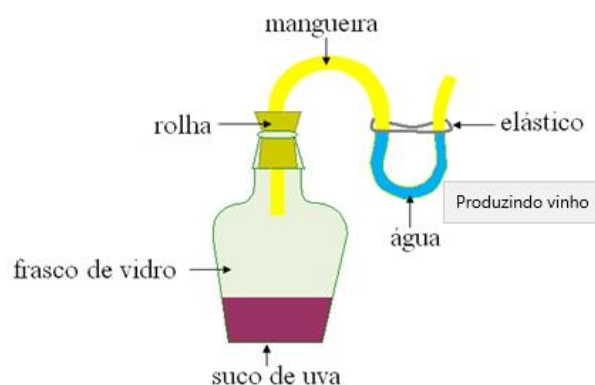


Figura 1 – Esquema da produção de vinho. Fonte: Brasil Escola (2018)

7. Depois de cerca de 10 dias, pegue a solução dentro do garrafão e filtre. Esse filtrado é o vinho.

Produção de cachaça

A produção de álcool a partir de caldo de cana em sala de aula é uma atitude possível que pode possibilitar aos alunos uma forma atrativa de aprender e compreender os fenômenos químicos.

A cana de açúcar é a matriz para a produção de vários produtos, entre eles: cachaça, rapadura, caldo de cana e até álcool combustível. Um dos fatores a serem controlados é o tempo de fermentação para obter produtos como cachaça e álcool combustível.

Exercícios

- 1) O que altera a coloração do vinho e do suco (branco, tinto, rose)?
- 2) Qual a finalidade da água retida na mangueira do experimento?
- 3) Além dos diferentes tipos de açúcares, qual outro fator pode afetar a intensidade da fermentação?
- 4) O sal de cozinha poderia substituir o açúcar na fermentação alcoólica? Faça um teste.
- 5) A partir da aula de hoje, conceitue fermentação.
- 6) Quais foram as características do produto após a filtração (pureza, odor...)?
- 7) Quais fatores operacionais do processo industrial podem interferir no processo de fermentação?

Referências

- BRASIL. Lei n.º 7678/1988. **Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências.** 1988.
- BRASIL. DECRETO Nº 8.198, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2014. Regulamenta a Lei n. 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Brasília, DF. 2014.
- Brasil Escola. Canal do Educador. Produção de vinho. Disponível em: < <https://educador.brasilecola.uol.com.br/estrategias-ensino/producao-vinho.htm> >.
Acesso: 31 out. 2018.
- NASCIMENTO, R. P.; et al. **Microbiologia Industrial: bioprocessos (volume 1).** Bernardo Dias Ribeiro et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 674p. 2018.
- RESENDE, D. A; CASTRO, R. A.; PINHEIRO, P. C. O Saber Popular nas Aulas de Química: Relato de Experiência Envolvendo a Produção do Vinho de Laranja e sua Interpretação no Ensino Médio. **Revista Química Nova Escola.** 2010. Disponível em: < http://webeduc.mec.gov.br/portaldoprofessor/quimica/sbq/QNEsc32_3/04-RSA-5409.pdf >. Acesso: 31 Out. 2018.
- REVISTA SUPERINTERESSANTE. Qual a diferença entre o fermento químico e biológico? Disponível em: < <https://super.abril.com.br/saude/qual-a-diferenca-entre-os-fermentos-biologico-e-quimico/> >. Acesso: 31 out. 2018.
- RIBEIRO, B. D.; et al. **Microbiologia Industrial (volume 2).** Bernardo Dias Ribeiro et al. (Org.). 1ª ed, Rio de Janeiro – RJ. Editora Elsevier. 470p. 2018.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al.. Porto Alegre: Artmed, 10ª ed, 2012. 934p.

9.1.2 – Experimento básico e visual sobre fermentação

Objetivos

* Comparar a fermentação sob diferentes matrizes e com uso de alimentos do cotidiano. **Duração:** 2 aulas

Fermentação

A fermentação é um processo que ocorre na ausência de oxigênio e consiste na quebra de glicose em substâncias mais simples, podendo ser realizado por

diversos tipos de bactérias e fungos. A atividade a seguir é com o fungo *Saccharomyces cerevisiae*, o tradicional fermento de padaria, o qual se dá a fermentação alcoólica.

Método

Materiais: Quatro tubos de ensaio para cada grupo; - Balões (mesmo número de tubos de ensaio); Água; Açúcar; Fermento.

Organizar os tubos de ensaio em 4 grupos: I- Água; II- Água+ açúcar; III- Água + fermento; IV- Água + fermento+ açúcar.

Coloque um balão na “boca” de cada tubo de ensaio e aguarde para registrar os resultados.

Exercícios

- 1) Qual foi o resultado encontrado e qual a explicação para o mesmo?

Referências

Brasil Escola. Site. Disponível em: <

<https://educador.brasilecola.uol.com.br/estrategias-ensino/observando-fermentacao.htm> >. Acesso: 18 jun. 2018.

9.2 – AULAS EXTRAS: A QUÍMICA E A FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E NÃO ALCOÓLICAS

O presente subitem tem por finalidade promover algumas práticas sobre fermentação e que se aplicam ao cotidiano da Indústria de Alimentos. Assim, de forma aplicada, estas práticas permitirão o aprofundamento das técnicas de fermentação.

9.2.1 – Cultivo de Leveduras para produção de cerveja

Objetivos

* Realizar testes para caracterização fisiológica e seleção de diferentes linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* com potencial para produção de cerveja

Duração: 4 aulas

A produção de cerveja

A cerveja é uma bebida de malte resultante da fermentação alcoólica do extrato aquoso do malte de cevada com lúpulo. O processo cervejeiro é consequentemente um processo de múltiplos estágios envolvendo a conversão biológica de materiais *in natura* em produto final. O desempenho das leveduras cervejeiras na fermentação, que é a habilidade das leveduras em metabolizar eficientemente os constituintes do mosto em etanol e em outros produtos da fermentação a fim de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade, é influenciada e controlada por vários fatores:

- Características Genéticas: a escolha da cepa de levedura empregada;
- Fisiologia Celular: a tolerância ao stress pelas células de levedura, a viabilidade e a vitalidade das células e a concentração celular do inoculo;
- Disponibilidade Nutricional: a concentração e a natureza do nitrogênio assimilável, a variedade e a concentração de açúcares no mosto e a disponibilidade de íons metálicos;
- Condições Físicas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto.

Nas leveduras cervejeiras industriais existem características significativamente diferentes de crescimento. Por exemplo, na maioria das fermentações para elaboração de cervejas ale o processo é mais rápido (5 contra 14 dias) e conduzidos em temperaturas mais altas (20 contra 8°C) comparados com as fermentações com cepas de leveduras "*lager*". Tradicionalmente, as leveduras cervejeiras "*ale*" foram descritas como "de alta fermentação" ou seja, que se elevavam à superfície do líquido no final da fermentação formando uma película flutuante e espessa de biomassa que poderiam ser retiradas desta superfície. Já as leveduras *lager* foram descritas como "de baixa fermentação" floculando na base do fermentador no final da fermentação formando uma fase sedimentada de biomassa apta a ser retirada no fundo da base do fermentador. Com o emprego de altos fermentadores cilindro cônicos (de aproximadamente 20 m) as leveduras de baixa fermentação podem ser utilizadas atualmente na produção de cervejas ale e as

diferenças de processamento entre as leveduras *ale* “de superfície” e as leveduras *lager* “floculantes” tem se tornado cada vez menos discriminativas e usuais.

Apesar da existência de diferentes linhagens cervejeiras do gênero *Saccharomyces*, novos estudos utilizando leveduras não-*Saccharomyces* para produção de bebidas tem demonstrado potencial. Diante disso, os estudos dos parâmetros fermentativos, das características fisiológicas e das melhores condições de fabricação devem ser analisados para possibilitar a seleção de novas leveduras cervejeiras.

Método

A linhagem de levedura mais usual para produção de cerveja é da *S. cerevisiae*. Caso seja possível, providencie outras linhagens, caso contrário, proceda aos testes somente com uma mesma linhagem para fins de observação. Outras linhagens possíveis: Duas do gênero *Saccharomyces*, sendo elas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* e duas não *Saccharomyces*, sendo elas, *Starmerella meliponinorum* e *Torulaspora delbrueckii*. A partir da escolha dessas leveduras, podem ser realizados testes quanto a: fermentação da Maltose, teste de tolerância ao etanol, teste de melhor temperatura de crescimento e teste de produção de H₂S.

1. Teste de fermentação de maltose

Para o teste de fermentação da Maltose, transfira uma alçada de cada uma das linhagens de levedura para tubos de ensaio devidamente identificados, contendo água para homogeneização do inóculo. Posteriormente transfira 100 microlitros de cada inóculo para 2 tubos de ensaio contendo meio mínimo (0,5% peptona, 0,5% extrato de levedura) + 6% de maltose e com tubos de Durhan. Em seguida, incubar as leveduras a 10 e 20°C e observar se ocorrerá a formação de bolhas no interior dos tubo de Durhan, podendo ocupar 1/3, 2/3 ou 3/3 do tubo, indicando se houve ou não a fermentação e qual foi a sua performance.

2. Teste de tolerância ao etanol

Para este teste, inocular 20 microlitros de cada inóculo de levedura em placas contendo meio YM (0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 1% glicose e 2% ágar) e contendo diferentes concentrações de etanol, sendo elas,

10 e 12%. Após esse procedimento, as placas devem ser incubadas a 25°C por 7 dias para observar se houve ou não o crescimento de culturas.

3. Teste de melhor temperatura de crescimento

Inocular 10 microlitros de cada inóculo de levedura em placas contendo meio YM e incubá-las nas temperaturas de 10, 15 e 30°C por 7 dias para avaliar se houve ou não o crescimento das leveduras.

4. Teste de produção de H₂S

Para o teste de produção de H₂S, transferir uma alçada da levedura para placas contendo meio ágar bismuto sulfito (Difco) e incubar por 7 dias a 25°C para observar se houve ou não o escurecimento das colônias após esse período, indicando a ocorrência da produção do H₂S.

Exercícios

1) O gênero *S. cerevisiae* é utilizado para produção de vários gêneros alimentícios e até de bebidas. São todas da mesma espécie? Justifique. (lembre-se da aula teórica sobre linhagem e cepa).

2) Quais são os tipos de cerveja apresentados? Que características operacionais a distinguem?

Referências

BARONY, F. J. A. Acervo particular: Anotações de aula do curso de Especialização em Microbiologia Aplicada – ICB: Instituto de Ciências Biológicas. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

9.2.2 – Bebidas fermentadoras e ação probiótica

Objetivos

* Verificar quantitativamente a concentração de microrganismos em leite fermentado comercializado;

* Discutir conceitualmente o papel dos produtos probióticos.

Duração: 4 aulas

Probióticos

Dentre os diferentes tipos de leites fermentados que podem ser obtidos, os produtos elaborados com bactérias probióticas apresentam grande interesse atualmente. As bactérias probióticas são microrganismos vivos, que, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, além dos relacionados aos efeitos nutricionais em geral (OMS, 2002; BRASIL, 2018). Há estudos que os correlacionam inclusive com melhoras da microbiota intestinal (tratamento e prevenção de diarreia), e até ação anticarcinogênica (FARIA, 2006).

Método

a) Providenciar leites fermentados de diferentes marcas (normalmente são encontradas 5 marcas no comércio);

b) Verificar a data de validade e registrar;

c) Uma alíquota de 25g de cada leite fermentado será homogeneizada em 225 ml de H₂O peptonada (meio de cultura utilizada para cultivo de organismos não fastidiosos e para realização de testes de indol) esterilizada (diluição 10⁻¹). **OBS.:** O triptofano é um aminoácido essencial que pode sofrer oxidação por atividades enzimáticas (realizado pela enzima triptofanase), convertendo-o em Indol. Se o indol persistir no meio, ele persiste no meio e fica visível na parte superior do tubo de ensaio, após a adição de um reagente Kovac's. A cor **amarela** indica que o substrato triptofano não foi hidrolisado no meio (reação negativa). A coloração **vermelha** é indol positivo. É um importante teste bioquímico;

d) A partir desta diluição serão realizadas outras centesimais seriadas até 10⁻⁷ (1 ml da diluição 10⁻¹ para um tubo de ensaio com 9,0ml de PBS (tampão fosfato salino e que pode ser preparado no laboratório) estéril para obter 10⁻² e assim por diante);

e) Uma alíquota de 1 ml das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁶ será semeada em placas de Petri vazias, onde serão vertidos 20 ml de ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), fundido e resfriado (atentar para o uso do Banho Maria). Elaborar 360 ml de Ágar MRS;

f) Incubar a 37°C por 48h (IDF, 1988).

Leitura e interpretação

No meio MRS, há crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, preferencialmente. Deve-se anotar o número de tipos morfológicos das colônias presentes. Fazer o teste de gram das colônias e o teste de catalase (peróxido de hidrogênio a 3% em lâmina de microscopia). Para enumeração, os dados são expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) de leite fermentado, como por exemplo:

Plaqueamento em profundidade, diluição 10^{-2} , com 25 colônias presentes, cinco submetidas à confirmação, quatro confirmadas (80%): $UFC/g = 25 * 10^2 * 0,8 = 2 * 10^3$

Exercícios

- 1) Quais são os benefícios dos probióticos?
- 2) Qual a concentração recomendada para um produto probiótico (leite fermentado)? (veja anotações da aula teórica)
- 3) Qual a finalidade do meio BPS no procedimento acima?
- 4) O que assegura que um produto é de fato probiótico?

Referências

BARONY, F. J. A. Acervo particular: Anotações de aula do curso de Especialização em Microbiologia Aplicada – ICB: Instituto de Ciências Biológicas. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos. 2018.

Disponível em: < http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900 >. Acesso: 19 abr. 2019.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. L. L. Análise de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei* e suplementado com *Bifidobacterium longum*, **Ciências Agrárias**, v.27, n.3, p.407-414, 2006. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/html/4457/445744081009/> >. Acesso: 19 abr. 2019.

IDF - International Dairy Federation. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. **IDF Standard 117A**. Brussels: IDF, 1988. 4p.

APÊNCIDE I – MODELO DE RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA

RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA N° _____

CURSO: Téc. Integrado Química – 1º Ano

Disciplina: Laboratório de Microbiologia Industrial Professor: Flávio Barony

Data: _____ Valor: _____ Nota: _____

Nome do estudante (trio) _____ Turma: _____

Orientações:**- Seja objetivo e siga as instruções para elaboração do relatório. Faça com letra legível. Utilize o verso, caso necessário.**

1 – Título:

2 - Introdução:

3 - Objetivos:

4 – Material e métodos:

5 – Resultados:

6 – Conclusão:

7 – Bibliografia:

**APÊNDICE 3 – ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA
CONFORME CONTEÚDO DO EMENTÁRIO (VERSÃO DO ESTUDANTE)**

OBS.: texto idêntico ao apêndice 2, exceto pelas respostas e ou
explicações ao longo do texto.

APÊNDICE 4 – NOVO LAYOUT DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

