UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CONTRIBUIÇÕES PARA O ENSINO PRÁTICO DE BIOQUÍMICA.

SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA EM UMA DISCIPLINA DE GRADUAÇÃO

Remo Trigoni Júnior

Dissertação de Mestrado

Orientador

Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres

São Paulo

2005

REMO TRIGONI JÚNIOR

CONTRIBUIÇÕES PARA O ENSINO PRÁTICO DE BIOQUÍMICA.

Simulação de um Projeto de Pesquisa em uma Disciplina de Graduação

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador:Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres

São Paulo

2005

T
574.19207
T 823c

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Trigoni Júnior, Remo
T828c Contribuições para o ensino prático de bioquímica. Simulação de um projeto de pesquisa em uma disciplina de graduação / Remo Trigoni Júnior. -- São Paulo, 2005.
245p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Torres, Bayardo Baptista

1. Bioquímica : Ensino 2. Bioquímica : Laboratório 3. Metodologia do ensino 4. Ensino : Aprendizagem : Avaliação I. T. II. Torres, Bayardo Baptista, orientador.

574.19207 CDD

"Contribuições para o ensino prático de bioquímica. Simulação de um projeto de pesquisa em uma disciplina de graduação"

REMO TRIGONI JÚNIOR

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. BAYARDO BAPTISTA TORRES
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ – USP

Profa. Dra. MARIA LUCIA VITAL DOS SANTOS ABIB
FE – USP

SÃO PAULO
29 DE SETEMBRO 2005

A minha FAMÍLIA, os meus grandes amores:

Remo Trigoni,

Zélia Nunes Fraga,

Noélia Nunes Fraga Trigoni (*in memorian*),

Ana Paula Fraga Santana,

Raphaela de Castro Georg.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Força que nos guia.
A Remo Trigoni, meu pai, pelo caráter, honestidade e retidão que me ensinou e ainda ensina o que é ser um verdadeiro homem.
A Zélia Nunes Fraga, minha segunda mãe até os 14 anos, e após o falecimento da primeira, minha mãe completa. Pelo amor incondicional e preocupação pelo seu filho (um tanto quanto excessiva, devo ressaltar!).
A minha mãe, Noélia Nunes Fraga Trigoni, pelos conselhos, experiências e carinhos que ainda hoje, após mais de quatorze anos de ausência, lembro com muitas saudades.
A minha prima, Ana Paula Fraga Santana, por cuidar de tudo aquilo que é meu, e mais, por cuidar dos dois velhos mais queridos da minha vida.
A minha mulher, Raphaela de Castro Georg, pelo racionalismo quando sou irracional, pela calma quando sou bravo, pelo amor quando sou ódio, por ser um oceano de paz, amor, compreensão e alegria nessa tempestade que sou, por ser tudo aquilo que uma companheira pode ser, e um pouquinho mais...
Ao Prof. Bayardo Baptista Torres, pela paciência, paciência, paciência, paciência, paciência, paciência neste mestrado. Por ser uma figura humana admirável, compreensiva, inigualável, inestimável, inimitável, incrível, único. Mais que um orientador. Um Mestre.
Ao Dr. Guilherme Andrade Marson, por ser completamente maluco, e pelos olhares durante os expedientes no LEB.
Aos Mestres Bruno Brasil Horta e Adair Vieira Júnior, pelos quase dez anos de convivência e por serem grandes amigos.
Ao Dr. Fábio Siviero, pela oportunidade de me tornar seu amigo. E por ser uma pessoa tão boa.
Ao pessoal da LEB: André, Paulo, Sílvia, Noboru e Montagna por ter de me suportar nos meus dias bons e sobretudo nos ruins.
Aos Professores Pedro Soares de Araújo e Iolanda Midea Cuccovia, pela oportunidade única (e muitas vezes dolorosa) de convívio profissional.
A Professora Clélia Ferreira, pela preocupação e por ser uma pessoa extremamente amável.
Aos Professores Sandro Roberto Marana, Ricardo P. do Souto, Robert Ivan Schumacher e Maria Terêza Machini de Miranda, pela oportunidade de trabalharmos juntos.
A Valéria, aluna, monitora, e amiga.
A Dra. Joelma Freire De Mesquita, por ser professora do curso de férias e por ser uma ótima ajuda nos tempos caóticos do B10.
A Alex, Mig, Elvis, Helena, Maria, Paula, Teresa e Larissa, os melhores monitores do mundo.
Aos meus estudantes nesses anos de 2002 e 2003, a razão de ser desta Dissertação, os melhores alunos do mundo.
À Drogaria São Paulo, pela oportunidade de trabalhar e continuar com meus afazeres acadêmicos.
À Cida, pela ajuda nas horas mais arrepiantes.
Ao Professor Walter Terra, por ceder seu laboratório no início do Mestrado.
Ao Departamento de Bioquímica, pela harmoniosa convivência.
Ao CNPq, pela bolsa concedida.
A todos aqueles que passaram pela minha vida e que me fizeram crescer, porque foi simplesmente INCRÍVEL.
UM ENORME BEIJO A TODOS.

RESUMO

A Educação Superior passa por importantes transformações, provocadas pelo aumento quantitativo de estudantes e pelo crescimento exponencial de informações, que extrapola a capacidade de assimilação dos cursos de graduação. Organismos internacionais e nacionais vêm sugerindo diretrizes e estratégias para a superação das dificuldades atuais.

Atendendo estas recomendações, foi criada uma disciplina prática de bioquímica, no nível de graduação, seguindo o referencial teórico sócio-construtivista. O eixo norteador da disciplina foi a simulação de um projeto de pesquisa. A disciplina foi organizada para que, por meio dela, pudessem ser desenvolvidas as habilidades e competências que promovessem a autonomia intelectual dos estudantes. Operacionalmente, a estrutura da disciplina baseou-se em (1) aulas de planejamento, que antecediam (2) as aulas de manipulação, seguidas de (3) tratamento de dados e (4) análise de resultados. Os quatro tipos de atividades eram realizados em pequenos grupos, assessorados por professores e monitores.

A avaliação da disciplina foi feita aplicando-se questionários para estudantes, monitores e professores. As respostas às questões mais relevantes dos questionários foram trianguladas, permitindo compor um quadro geral dos resultados obtidos.

A grande maioria dos participantes afirmou que a disciplina simulou um projeto de pesquisa, apontando características, como seqüência lógica e estímulo a habilidades críticas. Monitores e professores participantes declararam preferir esta forma de ministrar aulas práticas, por estarem convencidos de que ela leva a um melhor aprendizado.

INSTITUTO
Universidade de São Paulo

ABSTRACT

The Higher Education has been target of important transformations, caused by the increasing amount of students and by the exponential growth of information, which is bigger than the assimilation capacity of graduation courses. International and national organisms have suggested directives and strategies to overcome the current difficulties.

To attend these recommendations, a practical discipline of biochemistry, addressed to graduation students was created following the theoretical social constructivism referential. The directional axis of this discipline was the simulation of a research project. The discipline was organized intending that students could develop abilities and competencies that would promote their intellectual autonomy. Methodologically, the discipline structure was based in: (1) planning classes, that preceded (2) manipulation classes, followed by (3) data treatment and (4) results analysis. The four activities types were conducted in small groups, assisted by teachers and teaching assistants.

The discipline assessment was carried out applying questionnaires to students, teachers and teaching assistants. The answers to the most relevant questions of the questionnaires were processed, and allowed the composition of a general picture of the results obtained.

Most of the participants stated that the discipline simulated a research project, pointing out some characteristics, as logic sequence and stimulation of critical abilities. Teaching assistants and teachers declared to prefer this way of teaching practical classes, because they are convinced that it leads to a better learning.

RESUMEN

La Educación Superior pasa por importantes transformaciones, provocadas por el aumento cuantitativo de estudiantes y por el crecimiento exponencial de informaciones, que va más allá de la capacidad de asimilación de las carreras de grado. Organismos internacionales y nacionales vienen sugiriendo directrices y estrategias para la superación de las dificultades actuales.

Teniendo en cuenta estas recomendaciones, fue creada una materia práctica de bioquímica, en el nivel de grado, siguiendo como referencia el marco teórico socio-constructivista. El eje orientador de la materia fue la simulación de un proyecto de investigación. La materia fue organizada para que, por medio de ella, se pudiesem desenvolver las habilidades y las capacidades que promoviesen la autonomía intelectual de los estudiantes. Operacionalmente, la estructura de la materia se basó en (1) clases de planificación, que precedíam a (2) las clases de manipulación, seguidas de (3) tratamiento de los datos y (4) análisis de los resultados. Los cuatro tipos de actividades fueron realizados en grupos pequeños, asesorados por profesores y docentes auxiliares.

La evaluación de la materia fue hecha mediante la aplicación de cuestionarios a estudiantes, docentes auxiliares y profesores. Las respuestas a las preguntas más relevantes de los cuestionarios fueron trianguladas, permitiendo componer un cuadro general de los resultados obtenidos.

La gran mayoría de los participantes afirmó que la materia simuló un proyecto de investigación, apuntando características, como secuencia lógica y estímulo a las habilidades críticas. Docentes auxiliares y profesores participantes declararon que preferían esta forma de desarrollar trabajos prácticos, debido a que estaban convencidos de que conduce a un mejor aprendizaje.

RIASSUNTO

La Educazione Superiore passa per sostanziali transformazioni, suscitatte dello ingrandimento in quantità di studenti i della crescita esponenziale di informazioni, chi sorpassa la capacità di assimilazione degli corsi di graduazioni. Organizzazioni internazionali i nazionali suggerono direttrice i tattiche per la superazione dei difficoltà presenti.

In attenzione a queste raccomandazione, fu creata uma disciplina pratica di Biochimica, in livello di graduazioni, seguendo il riferimento teorico socioconstruttivista. Il sostegno della disciplina è la simulazione di um piano di ricerca. La disciplina è disposta affine di svilluparsi le abilità i spettanze per fomentare la autonomia intellettuale dei studenti. La strutura della disciplina è fondata in (1) lezione di progetto; (2) lezione di manipulazione, poi di (3) trattamento di informazioni; (4) analisi di risultati. Le quattro sorti di atività sono effetuate in piccoli gruppi, consigliari per professori i assistenti.

La valutazione della disciplina fu effetuata impiegando questionari per studenti, professori i assistenti. Le risposti a le più rilevanti questioni furono triangolare, permettendo tessere un panorama degli risultati ottenuti.

La maggioranza degli participanti attestano che la disciplina ho simulato effetivamente um piano di ricerca, segnalandocaratteristiche come sequenza logica i stimolo delle abilità critica. Assistenti i professori hanno declarato preferenza a questa forma di lezione pratica – sono convinti di um migliore apprendimento dovuto a la disciplina.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO 1

1.1. DIRETRIZES 2

1.1.1. UNESCO 6

1.1.2. BID 8

1.1.3. IBE 9

1.1.4. MEC 10

1.2. OBJETIVOS DAS AULAS PRÁTICAS 13

1.3. TEORIAS DE APRENDIZAGEM 19

1.4. CARACTERÍSTICAS DAS AULAS BASEADAS EM PROJETOS 22

2.OBJETIVOS 27

2.1. OBJETIVOS GERAIS 28

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

3.MÉTODOS & PROCEDIMENTOS 29

3.1. ESCOLHA 30

3.2. AJUSTE 31

3.3. MONTAGEM 32

3.3.1. ETAPA 1 32

3.3.2. ETAPA 2 33

3.3.3. ETAPA 3 34

3.3.3.1. AULAS DE PLANEJAMENTO 36

3.3.3.2. AULAS DE MANIPULAÇÃO 40

3.3.3.3. AULAS DE TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE DOS RESULTADOS 41

3.3.3.3.1. AULAS DE TRATAMENTO DE DADOS 41

3.3.3.3.2. AULAS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS 43

3.4. APLICAÇÃO 43

3.4.1. PARTICIPANTES E PERÍODOS DE AULAS 43

3.4.2. DIVISÃO DE TRABALHO 45

3.4.2.1. DOCENTE (PROFESSORES E MONITORES) 45

3.4.2.2. DISCENTE 45

3.4.2.3. FORMAS DE AVALIAÇÃO DOS ESTUDANTES 47

3.5. AVALIAÇÃO 47

3.6. OBSERVAÇÕES GERAIS 48

4.RESULTADOS & DISCUSSÃO 49

PARTE I – ESTUDANTES 52

4.1. AS AULAS PRÁTICAS SIMULARAM UM PROJETO DE PESQUISA? 53

4.1.1. CATEGORIA I – SIM 54

4.1.2. CATEGORIA II – NÃO 56

4.1.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE 57

4.1.4. REFORMULAÇÃO DA QUESTÃO 58

4.2. O QUE É UM PROJETO DE PESQUISA 59

4.2.1. CATEGORIA I – TEMA GERADOR 59

4.2.2. CATEGORIA II –PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 60

4.2.3. CATEGORIA III – CONCLUSÃO 60
4.2.4. CATEGORIA IV – HABILIDADES CRÍTICAS 61
4.2.5. CATEGORIA V – OUTROS 62
4.2.6. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS 63
4.3. A DISCIPLINA BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL SIMULOU UM PROJETO DE PESQUISA? 65
4.3.1. CATEGORIA I – SIM 65
4.3.2. CATEGORIA II – NÃO 68
4.3.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE 70
4.3.4. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS 70
4.4. QUAL A MELHOR ESTRATÉGIA PARA AS AULAS PRÁTICAS? 72
4.4.1. CATEGORIA I – SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA 72
4.4.2. CATEGORIA II – PRÁTICAS INDEPENDENTES 75
4.4.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE 77
4.4.4. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS 77
PARTE II – MONITORES 78
4.5. VOCÊ ACHA QUE ESTE TIPO DE DISCIPLINA LEVA A UM MELHOR APRENDIZADO? 79
4.5.1. CATEGORIA I – SIM 79
4.6. A FORMA DE CONDUZIR A DISCIPLINA (COMO SIMULAÇÃO DE UM PROJETO) PERMITE ENSINAR MELHOR OS ESTUDANTES DO QUE AS FORMAS CONVENCIONAIS? 81
4.6.1. CATEGORIA I – SIM 81
4.6.2. CATEGORIA III – OUTRAS CONSIDERAÇÕES 82
4.7. COMO VOCÊ PREFERE MINISTRAR UM CURSO EXPERIMENTAL? 84
4.7.1. CATEGORIA I – SIM 84
4.8. QUAIS AS PRICNIPAIS VANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA? 87
4.8.1. CATEGORIA I – ESTÍMULO A HABILIDADES CRÍTICAS 87
4.8.2. CATEGORIA II – PARTICIPAÇÃO DISCENTE 88
4.8.3. CATEGORIA III – SEQÜÊNCIA LÓGICA 88
4.8.4. CATEGORIA IV – DEMAIS RESPOSTAS 88
4.9. QUAIS AS PRINCIPAIS DESVANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA? 89
4.9.1. CATEGORIA I – MOTIVAÇÃO DISCENTE 89
4.9.2. CATEGORIA II – ANDAMENTO DA DISCIPLINA 90
4.9.3. CATEGORIA III – MATURIDADE DISCENTE 91
4.9.4. CATEGORIA IV – TEMPO DE DEDICAÇÃO E NÚMERO DE PARTICIPANTES 92
PARTE III – PROFESSORES 93
4.10. VOCÊ ACHA QUE ESTE TIPO DE DISCIPLINA LEVA A UM MELHOR APRENDIZADO? 94
4.10.1. CATEGORIA I – SIM 94
4.10.2. CATEGORIA III – OUTRAS CONSIDERAÇÕES 95
4.11. A FORMA DE CONDUZIR A DISCIPLINA (COMO SIMULAÇÃO DE UM PROJETO) PERMITE ENSINAR MELHOR OS ESTUDANTES DO QUE AS FORMAS CONVENCIONAIS? 96
4.11.1. CATEGORIA I – SIM 96
4.11.2. CATEGORIA III – OUTRAS CONSIDERAÇÕES 97
4.12. COMO VOCÊ PREFERE MINISTRAR UM CURSO EXPERIMENTAL? 98
4.12.1. CATEGORIA I – SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA 98
4.12.2. CATEGORIA III – SEM OPÇÃO 99
4.13. QUAIS AS PRICNIPAIS VANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA? 100

4.14. QUAIS AS PRINCIPAIS DESVANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA? 102
PARTE IV – ESTUDANTES 104
4.15. AS AULAS DE PLANEJAMENTO ATINGIRAM SEUS OBJETIVOS? 105
4.15.1. CATEGORIA I – SIM 105
4.15.2. CATEGORIA II – NÃO 107
4.15.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE 108
4.15.4. OBSERVAÇÕES FINAIS 110
4.15.5. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS 110
4.16. AS AULAS DE TD+AR ATINGIRAM SEUS OBJETIVOS? 112
4.16.1. CATEGORIA I – SIM 112
4.16.2. CATEGORIA II – NÃO 113
4.16.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE 114
4.16.4. OBSERVAÇÕES FINAIS 116
4.16.5. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS 116
PARTE V – MONITORES 118
4.17. AS AULAS DE PLANEJAMENTO ATINGIRAM SEUS OBJETIVOS? 119
4.17.1. CATEGORIA I – SIM 119
4.17.2. CATEGORIA II – NÃO 120
4.17.3. OBSERVAÇÕES FINAIS 120
4.18. AS AULAS DE TD+AR ATINGIRAM OS OBJETIVOS PROPOSTOS? 121
4.18.1. CATEGORIA I – SIM 121
4.18.2. CATEGORIA II – NÃO 122
PARTE VI – PROFESSORES 123
4.19. AS AULAS DE PLANEJAMENTO ATINGIRAM SEUS OBJETIVOS? 124
4.20. AS AULAS DE TD+AR ATINGIRAM OS OBJETIVOS PROPOSTOS? 128
4.20.1. CATEGORIA I – SIM 128
4.20.2. CATEGORIA III – PARCIALMENTE 129
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 130
6. BIBLIOGRAFIA 133
7. APÊNDICES 140
7.1. APÊNDICE I – QUESTIONÁRIO 1 – ESTUDANTES – 2002 – DIURNO 140
7.2. APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO 1 – ESTUDANTES – 2002 - NOTURNO 148
7.3. APÊNDICE III – QUESTIONÁRIO 2 – ESTUDANTES – 2003 153
7.4. APÊNDICE IV – QUESTIONÁRIO 3 – MONITORES 160
7.5. APÊNDICE V – QUESTIONÁRIO 4 – PROFESSORES 162
7.6. APÊNDICE VI – APOSTILA DA DISCIPLINA 164

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Distribuição do número de estudantes de pós-graduação no Brasil 4
Fig. 2 – Número de resumos publicados anualmente no *Chemical Abstracts* 4
Fig. 3 – Número acumulado de resumos publicados no *Chemical Abstracts* 5
Fig. 4 – Distribuição Total do Tempo – Diurno – 2003 39
Fig. 5 – Distribuição das respostas da Questão 12 do Questionário 1 – Diurno 53
Fig. 6 – Distribuição das respostas da Questão 11 do Questionário 1 – Noturno 54
Fig. 7 – Distribuição das respostas da Questão 12A do Questionário 2 59
Fig. 8 – Distribuição das respostas da Questão 12B do Questionário 2 65
Fig. 9 – Distribuição das respostas multicatégóricas da Questão 12B do Quest. 2 71
Fig. 10 – Distribuição das respostas da Questão 12C do Questionário 2 72
Fig. 11 – Distribuição das respostas multicategóricas da Questão 12C do Quest. 2 77
Fig. 12 – Distribuição das respostas da Questão 12 do Questionário 3 79
Fig. 13 – Distribuição das respostas da Questão 1 do Questionário 3 81
Fig. 14 – Distribuição das respostas da Questão 10 do Questionário 3 84
Fig. 15 – Distribuição das respostas da Questão 13 do Questionário 4 94
Fig. 16 – Distribuição das respostas da Questão 1 do Questionário 4 96
Fig. 17 – Distribuição das respostas da Questão 10 do Questionário 4 98
Fig. 18 – Distribuição das respostas da Questão 5B do Questionário 2 105
Fig. 19 – Distribuição das respostas da Questão 5B do Questionário 2 111
Fig. 20 – Distribuição das respostas da Questão 6C do Questionário 2 112
Fig. 21 – Distribuição das respostas da Questão 6C do Questionário 2 117
Fig. 22 – Distribuição das respostas da Questão 8 do Questionário 3 119
Fig. 23 – Distribuição das respostas da Questão 9 do Questionário 3 121
Fig. 24 – Distribuição das respostas da Questão 9 do Questionário 4 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição do número de estudantes matriculados (milhões) 3
Tabela 2 – Estilos de aulas práticas e suas respectivas variáveis 15
Tabela 3 – Artigos de disciplinas de projetos, colaborativas ou assemelhadas. 24-25-26
Tabela 4 – Distribuição da carga horária nos disciplinas 31
Tabela 5 – Habilidades procedimentais de cada prática 35
Tabela 6 – Distribuição das aulas de Planejamento 39
Tabela 7 – Distribuição das aulas de Manipulação 40
Tabela 8 – Distribuição das aulas de TDAR 42
Tabela 9 – Número total de participantes das disciplinas aplicadas 44
Tabela 10 – Distribuição dos estudantes pelas suas unidades de origem 44
Tabela 11 – Distribuição dos pesos das avaliações 47
Tabela 12 – Porcentagem de participantes que responderam os questionários 50
Tabela 13 – Perguntas selecionadas para análise e discussão 51
Tabela 14 – Distribuição de respostas afirmativas e negativas 116

INTRODUÇÃO

Esta Introdução é dividida em quatro seções. Na 1ª seção são discutidas as diretrizes gerais que orientaram o desenvolvimento e aplicação deste projeto. Na 2ª seção são introduzidos alguns conceitos sobre a importância geral de aulas práticas e, mais especificamente, a importância de aulas práticas de Bioquímica. Na 3ª seção é apresentado, de forma sumária, o arcabouço pedagógico utilizado nesta pesquisa. Ao final, na 4ª seção, é relatado o levantamento bibliográfico realizado neste projeto.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

1.1. DIRETRIZES

De acordo com o Documento de Política para a Mudança e Desenvolvimento na Educação Superior, da UNESCO[1], a humanidade é testemunha do extraordinário desenvolvimento da Educação Superior (ES), e está compreendendo cada vez melhor sua importância vitai para o seu desenvolvimento econômico e social (UNESCO, 1995).

A segunda metade do século XX passará à história da educação como um período de gigantesca expansão e transformações qualitativas da ES. Porém é fato que atualmente a educação superior está atravessando um período de crise em praticamente todos os países do mundo (UNESCO, 1995).

Define-se ES como programas de estudo, formação profissional ou formação para a investigação em nível pós-secundário, providos por universidades ou outras instituições educacionais reconhecidas como instituições de ensino superior pelas autoridades competentes dos Estados e/ou por sistemas de certificação reconhecidos (UNESCO, 1998).

A ES compreende diversas atividades apoiadas no tripé

a) ensino: educação de cidadãos responsáveis e altamente qualificados;

b) pesquisa: criação e transformação dos saberes da humanidade;

c) serviços: disseminação dos saberes na sociedade.

Além disso, a ES desempenha papel único para o desenvolvimento e melhoria da educação em todos os níveis (UNESCO, 1995).

O interesse da sociedade pela qualidade da ES se deve à sua necessidade por profissionais capacitados, que possam desempenhar adequadamente suas funções. As instituições de ES devem ser capazes de educar seus estudantes, para que estes se tornem cidadãos bem informados e motivados, possam pensar criticamente, analisar os problemas da sociedade, procurando e aplicando soluções para estes problemas e aceitando responsabilidades sociais (UNESCO, 1998). Marson (2003) afirma que

> *[...] as instituições de ensino superior têm papel estratégico, cabendo-lhes a tarefa de incorporar na formação de seus egressos as habilidades necessárias para o exercício pleno das funções no mundo do trabalho e da informação* (p. 1).

---

[1] UNESCO: United Nations Educational, Scientifical and Cultural Organization (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura).

É natural que a qualidade da ES deve-se à estreita sinergia entre professores e estudantes. A qualidade de instituições que formam profissionais capazes e competentes está diretamente ligada à qualidade docente, cujo corpo deve ser capaz de fazer com que seus estudantes atinjam níveis de excelência em suas formações.

O desenvolvimento econômico e social verificado na segunda metade do século passado também contemplou a ES, fazendo com que uma das características marcantes em seu desenvolvimento fosse sua expansão quantitativa. Entre 1960 e 1970 houve um aumento mundial de 115% no número de estudantes matriculados. Entre 1970 e 1980 esse aumento foi de 64%. Entre 1980 e 1991 chegou a 44%. No total, entre 1960 e 1991, o incremento registrado foi de 400%. Nos países em desenvolvimento esse aumento foi de espantosos 900%. A América Latina e Caribe registraram um salto de 300% (Tabela 1) (UNESCO, 1995). Em âmbito nacional, o número de estudantes em curso de pós-graduação também cresceu (Figura 1).

Tabela 1 – Distribuição do número de estudantes matriculados (em milhões)

Ano	Mundo	Países em desenvolvimento	América Latina e Caribe
1960	13	3	-
1970	28	7	2
1980	46	16	-
1991	65	30	8

Uma das conseqüências diretas desse fenômeno é a tendência da ES em

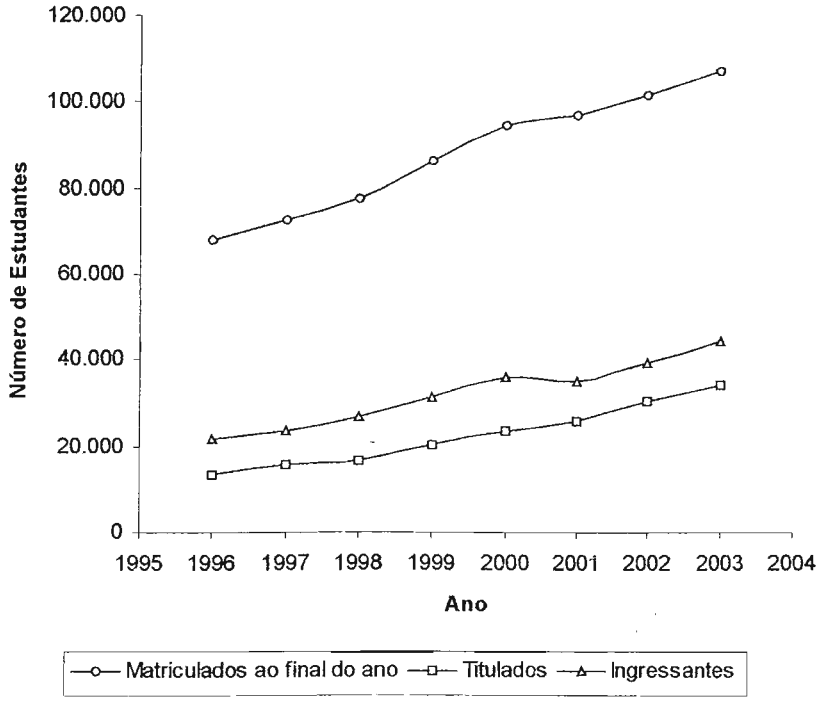
> *se transformar num sistema de* ***escolarização de massas***[2] *à medida que as economias modernas passam a utilizar de modo mais intensivo o conhecimento e necessitam, por sua vez, cada vez mais graduados do ensino superior, que constituem uma "força de trabalho intelectual"* (UNESCO, 1995, p. 16, TDOC[3],).

Outra tendência mostra que o tipo de profissional requerido pela sociedade está se modificando, pois

> *a necessidade de pertinência tem adquirido novas dimensões e uma maior urgência,* ***à medida que as atividades econômicas da sociedade requerem egressos capazes de atualizar constantemente seus conhecimentos e adquirir novos conhecimentos que lhes permitam não somente encontrar trabalhos, mas também criar empregos num mercado em constante mudança*** (UNESCO, 1995, p. 8, TDOC).

[2] Todos os trechos, frases e/ou excertos em negrito foram ressaltados pelo autor da dissertação.
[3] TDOC: Tradução Direta do Original em Castelhano; TDOI: Tradução Direta do Original em Inglês.

Figura 1 – Distribuição do número de estudantes de pós-graduação no Brasil (1996 – 2003) (Adaptado de CAPES, 2005)



Outro fato marcante para o desenvolvimento da ES é o aumento da quantidade de informações científicas existentes (Figuras 2 e 3). A UNESCO afirma que

> *o volume [...] de informação existente no mundo [...] é imensamente maior que o disponível há poucos anos e seu ritmo de crescimento continua acelerando [...]* (UNESCO, 2000, p. 74, TDOC).

Figura 2 – Número de resumos publicados anualmente no *Chemical Abstracts* (1907-2004) (Adaptado de CAS, 2004)

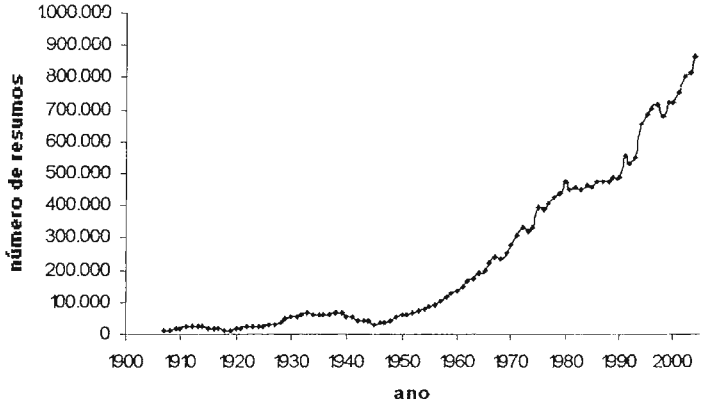
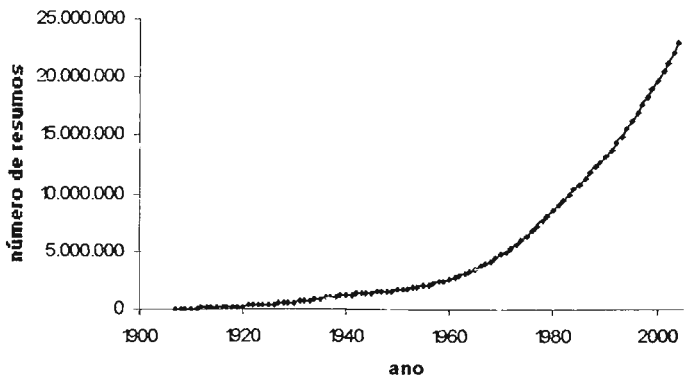


Figura 3 – Número acumulado de resumos publicados no *Chemical Abstracts* (1907-2004) (Adaptado de CAS, 2004)



Acrescido a esses fatores há o tremendo desenvolvimento tecnológico nos últimos tempos. Marson (2003) afirma que o

> *século XXI é apontado como o século da informação. Sustentados pelo arcabouço tecnológico digital da última década, a produção, trânsito e usufruto da informação aumentam numa taxa sem precedentes na História* (p. 1).

Os efeitos relatados têm íntima ligação, pois são fenômenos que caminham junto, retroalimentando-se mutuamente. O aumento na geração de informações não seria possível sem o concurso de estudantes, sejam graduandos e pós-graduandos, nos sistemas de pesquisa das instituições de ensino superior. O desenvolvimento global faz com que haja o surgimento e desenvolvimento de novos campos de pesquisa, que atraem cada vez mais estudantes para essas áreas. Cabe à tecnologia difundir novos e antigos conhecimentos de maneira muito mais veloz e sem barreiras, aumentando o intercâmbio cultural e intelectual e diminuindo distâncias entre os atores da produção do conhecimento.

As modificações do cenário em que a educação ocorre sugerem mudanças no modelo de ensino adotado nas instituições de ES (Marson, 2003). A boa condição de formação profissional estava condicionada à quantidade de conhecimento acumulada nos cursos de graduação. Enquanto os cursos de graduação conseguiam assimilar a quantidade de informação gerada, este modelo de ensino pôde ser satisfatoriamente aplicado sem maiores problemas.

Porém o ritmo atual de geração de conhecimento extrapola a capacidade de assimilação pelos cursos de ensino superior. É apresentado, portanto, um desafio à ES, cuja superação é mister.

Organismos internacionais e nacionais, tais como UNESCO, BID[4] e o MEC[5] brasileiro, analisam e comentam essas características, estabelecendo diretrizes que têm por função a busca dessa superação.

1.1.1. UNESCO

A UNESCO faz reiteradas afirmações sobre a importância de mudanças na ES, ressaltada em excertos de documentos de política sobre educação geral e superior.

> *A educação superior se destaca como uma das chaves para por em prática os processos mais amplos que são necessários para fazer frente aos desafios do mundo moderno [...]* ***Há a necessidade de uma nova visão da educação superior que combine as demandas de universalidade da educação superior e o imperativo de uma maior relevância*** *para responder às expectativas da sociedade na qual ela opera* (UNESCO, 1995, p. 28, TDOC).

> ***As novas modalidades de ensino constituem um componente cada vez mais viável de um projeto inovador para o ensino superior,*** *em particular porque se dirigem a uma nova categoria de usuários e propõem estratégias flexíveis para superar as desvantagens derivadas da organização tradicional dos estudos* (UNESCO, 1995, p. 36, TDOC).

Assim a ES, em função dessas tendências, deve repensar sua função e missão na sociedade, levando em conta as necessidades da

> ***sociedade em matéria de aprendizagem e capacitação permanentes*** (UNESCO, 1995, p. 8, TDOC).

Levando em conta as afirmações acima, diversas considerações e diretrizes são sugeridas, a fim de superar as dificuldades citadas na ES.

> *No entanto,* [afirma a UNESCO,] ***de modo algum deseja-se impor modelos ou formular receitas rígidas****; no melhor dos casos [...]* ***pode constituir uma "bússola intelectual" [...] para os encarregados da educação superior*** *no desenvolvimento de suas próprias políticas, levando em conta a diversidade inerente, as necessidades concretas e as condições imperantes nos planos nacional, regional e internacional* (UNESCO, 1995, p. 3, TDOC).

Convém ressaltar que as tendências apontadas e suas conseqüências

> *derivam de diferentes* ***experiências nacionais em todo o mundo e das opiniões expressas pelos Estados Membros, organizações intergovernamentais e não-governamentais, autoridades da educação superior, tomadores de decisões e investigadores*** (UNESCO, 1995, p. 15, TDOC).

As principais diretrizes, ressaltadas em diversos documentos oficiais da UNESCO, apontam a pertinência de **novas formas e modalidades de**

---

[4] BID: Banco Interamericano de Desenvolvimento (IADB: Inter-American Development Bank)
[5] MEC: Ministério de Educação

aprendizagem, de currículos mais flexíveis, do **desenvolvimento de habilidades e competências** diferentes, bem como da **aprendizagem de novos valores e atitudes.**

> *Limitar-se à ampliação do conteúdo dos programas de estudo e ao aumento do volume de trabalho dos alunos não pode ser uma solução duradoura. Pois há de se considerar prioritárias as disciplinas que contribuam ao* ***desenvolvimento das capacidades intelectuais dos alunos e que permitam adaptar-se razoavelmente às mudanças e às diversidades tecnológicas, econômicas e culturais*** *[...]* (UNESCO, 1995, p. 30-1, TDOC).

> *A renovação do ensino e da aprendizagem em educação superior é fundamental para melhorar sua pertinência e qualidade. Para isso* ***é necessário estabelecer programas que fomentem a capacidade intelectual dos estudantes [...] e aplicar métodos pedagógicos que aumentem a eficiência da experiência de aprendizagem*** (UNESCO, 1995, p. 9, TDOC).

É interessante notar que a UNESCO aponta a mudança do modelo conteudista, centrada na transmissão de conhecimentos, para um novo modelo, centrado no estudante como agente de transformação da sociedade.

> *Cada pessoa [...] deverá estar em condições de aproveitar as oportunidades educativas oferecidas para satisfazer suas* ***necessidades básicas de aprendizagem****. Estas necessidades abarcam tanto as ferramentas essenciais para a aprendizagem (como a leitura e a escrita, a expressão oral, o cálculo, a* ***solução de problemas****) como os conteúdos básicos da aprendizagem (****conhecimentos teóricos e práticos, valores e atitudes****) necessários para que os seres humanos possam [...]* ***tomar decisões fundamentadas*** *e* ***continuar aprendendo*** *[...]* (UNESCO, 2000, p. 75, TDOC).

> *Para alcançar esses objetivos, pode* ***ser necessário rearranjar currículos, usando métodos novos e apropriados, para ir além do domínio cognitivo das disciplinas****.* ***Novas abordagens pedagógicas e didáticas devem ser acessíveis e promovidas com o intuito de facilitar a aquisição de habilidades, competências e capacidades para comunicação, analises críticas e criativas, pensamento independente e trabalhos em grupos*** *[...]* (UNESCO, 1998, p. 6, TDOI).

> ***Haverá de se encontrar métodos menos formais e mais flexíveis de especialização e atualização de conhecimentos*** *[...]* (UNESCO, 1995, p. 35, TDOC).

> *[...] também se exigem uma* ***renovação de sua pedagogia, aprendizagem, investigação*** (UNESCO, 1995, p. 53, TDOC).

> ***Desenvolver competências para acompanhar e facilitar a aprendizagem durante toda a vida*** (UNESCO, 2000, p. 40, TDOC).

> *[...]* ***incluir como conteúdos de aprendizagem significativa as habilidades*** *[...]* (UNESCO, 2000, p. 39, TDOC).

Todos os jovens e adultos devem ter a oportunidade de assimilar o saber e ***aprender valores, atitudes e conhecimentos práticos****, que lhes servirão para* ***melhorar sua capacidade de trabalhar****, participar plenamente na sociedade, dirigir sua vida e* ***seguir aprendendo*** (UNESCO, 2000, p. 16, TDOC).

[...] os indivíduos aprendem verdadeiramente como resultado da aquisição de ***conhecimentos úteis, capacidade de raciocínio, atitudes e valores*** (UNESCO, 2000, p. 76, TDOC).

[...] educar incluindo treinamento profissional, que ***combine conhecimentos e habilidades de alto nível, utilizando disciplinas e conteúdos continuamente adaptados às necessidades presente e futura da sociedade*** (UNESCO, 1998, p. 3, TDOI).

Políticas públicas devem ser estabelecidas no que diz respeito aos professores ***de ensino superior, que nos dias de hoje precisam se focar sobre o ensino de estudantes, em aprender e [...] tomar iniciativa mais do que ser exclusivamente fontes de conhecimento****. Provisão adequada deve ser feita para a pesquisa e para aumentar e melhorar habilidades pedagógicas, através de programas de desenvolvimento de pessoal, encorajando constante inovação no curriculum e* ***nos métodos de ensino e aprendizagem*** (UNESCO, 1998, p. 7, TDOI).

Essas estratégias deverão abordar o novo papel dos docentes para ***preparar o aluno a uma nova economia baseada no saber*** *e movida pela tecnologia.* ***Os professores deverão entender a diversidade dos estilos de aprendizagem*** *[...]* (UNESCO, 1998, p. 21, TDOC).

1.1.2. BID

O Banco Interamericano de Desenvolvimento ressalta características e conseqüências da expansão da ES, porém aponta um fato de extrema importância sobre a qualidade discente.

A expansão acelerada da educação superior que começou em meados do século [XX] *se produziu em* ***condições que não foram conducentes a níveis aceitáveis de desempenho [...] do ponto de vista de qualidade****. Entre tais condições pode-se mencionar o* ***subdesenvolvimento e a instabilidade econômica, outras limitações fiscais, o atraso e a dependência em matéria de tecnologia, a repressão política e os distúrbios sociais e a indiferença cultural com respeito ao estudo científico e à investigação*** (IADB, 1997, p. 8, TDOC).

Com a liderança das universidades públicas, a educação superior tem produzido historicamente um acúmulo de profissionais [...] ***apesar de que também se estejam graduando muitos estudantes com uma preparação deficiente*** (IADB, 1997, p. 5, TDOC).

[...] uma série de indicadores [...] sugerem que os ***planos de estudos estão desatualizados,*** *que há falta de material didático* ***e que alguns estudantes passam pelo sistema com esforço e proveito mínimos,*** *sendo tudo isto comum tanto para o setor público como no privado [...]* (IADB, 1997, p. 9, TDOC).

O BID faz, adicionalmente, diversos apontamentos sobre como solucionar essas discrepâncias:

[...] ***o modelo tradicional da sala de aula centrada em torno de um conferencista passa a ser uma de muitas opções*** *[...]* (IADB, 1997, p. 10, TDOC).

O principal objetivo seria dar assistência às ***reformas encaminhadas para transformar um plano de estudos rígido e extremamente especializado em um plano de estudos com mais um tom de "aprender a aprender". Este é o objeto de uma boa educação geral.*** *Os planos de estudos rígidos de uma profissão determinada deveriam* ***ser substituídos por planos mais flexíveis, [...] junto com estudos gerais centrados na aquisição de habilidades críticas, comunicação escrita e capacidade de raciocinar*** *[...]* (IADB, 1997, p. 37, TDOC).

1.1.3. IBE[6]

A IBE, em sua 44ª Conferência Internacional de Educação, apontou algumas diretrizes já mencionadas anteriormente.

Sugerem-se diretrizes básicas que ***poderiam ser transformadas em estratégias,*** *políticas ou planos de ação em níveis institucionais ou nacionais de acordo com as condições das diferentes comunidades* (IBE, 1994, p. 23, TDOI).

Atentar [...] para formar num todo coerente as várias medidas desejadas [...], realinhando a educação em todos os níveis, ***repensando métodos e revendo materiais de ensino em uso, estimulando pesquisa,*** *desenvolvendo treinamento docente, ajudando a fazer o sistema educacional mais aberto à sociedade na forma de uma parceria ativa* (IBE, 1994, p. 24, TDOI).

A Educação deve desenvolver a capacidade de estimar a liberdade e as habilidades de encontrar suas mudanças. ***Isto significa preparar cidadãos para enfrentar dificuldades e situações incertas e prepará-los para autonomia pessoal e responsabilidade*** (IBE, 1994, p. 24, TDOI).

Em consideração aos métodos, o ***uso de métodos ativos, trabalho em grupo, a discussão de valores morais e ensino personalizado devem ser encorajados*** *[...]* (IBE, 1994, p. 27, TDOI).

---

[6] IBE: International Bureau of Education (Birô Internacional de Educação).

Novos problemas requerem novas soluções. *É essencial elaborar estratégias para* ***fazer o melhor uso das descobertas da pesquisa, para desenvolver novos métodos e abordagens*** *(...)* (IBE, 1994, p. 28, TDOI).

1.1.4. MEC

O Ministério da Educação, por meio do CNE-CES[7], também apontou diversas características da ES atualmente no país.

> *[...] os currículos dos cursos superiores, formulados na vigência da legislação revogada [...], em geral caracterizam-se por* ***excessiva rigidez*** *que advém, em grande parte, da fixação detalhada de mínimos curriculares e resultam na progressiva diminuição da margem de liberdade que foi concedida às instituições para organizarem suas atividades de ensino* (BRASIL, 1997).

Outro comentário enfatiza, vindo ao encontro do que o BID apontou, que

> *com efeito, muitos têm sido os fatos envolvendo profissionais que, embora graduados com qualidade em determinada época, se contentaram com o diploma que ostentam,* ***não mais acompanhando o avanço científico e tecnológico, deixando muito a desejar em seu desempenho técnico*** *(...)* (BRASIL, 2003).

Alguns pareceres contêm diretrizes gerais para o modo de atuação dos cursos de graduação:

> *Entende-se que as novas diretrizes curriculares devem contemplar elementos de fundamentação essencial em cada área do conhecimento, campo do saber ou profissão,* ***visando promover no estudante a capacidade de desenvolvimento intelectual e profissional autônomo e permanente*** *[...].* ***Devem induzir a implementação de programas de iniciação científica nos quais o aluno desenvolva sua criatividade e análise crítica*** *[...]* (BRASIL, 1997).

> *Os cursos de graduação precisam ser conduzidos, através das Diretrizes Curriculares, a abandonar as características de que muitas vezes se revestem, quais sejam as de* ***atuarem como meros instrumentos de transmissão de conhecimento e informações, passando a orientar- se para oferecer uma sólida formação básica, preparando o futuro graduado para enfrentar os desafios das rápidas transformações da sociedade, do mercado de trabalho e das condições de exercício profissional*** (BRASIL, 1997).

> *As diretrizes curriculares devem observar os seguintes princípios: [...]* ***5) Estimular práticas de estudo independente, visando uma progressiva autonomia profissional e intelectual do aluno;*** *[...]* ***7) Fortalecer a articulação da teoria com a prática, valorizando a pesquisa***

---

[7] CNE: Conselho Nacional de Educação.
CES: Câmara de Educação Superior.

individual e coletiva, assim como os estágios e a participação em atividades de extensão (BRASIL, 1997).

A Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional [...] ***assegura ao ensino superior maior flexibilidade na organização curricular dos cursos, atendendo à necessidade de uma profunda revisão de toda a tradição que burocratiza os cursos e se revela incongruente com as tendências contemporâneas de considerar a formação em nível de graduação como uma etapa inicial da formação continuada*** *[...]* (BRASIL, 2001).

De modo mais específico para o curso de graduação de Farmácia, as Diretrizes Curriculares estabelecem diversas diretivas, sendo algumas importantes e pertinentes para a presente dissertação.

O Curso de Graduação em Farmácia tem como perfil do formando egresso/profissional o Farmacêutico, ***com formação generalista, humanista, crítica e reflexiva*** *[...]* (BRASIL, 2002).

Cada profissional deve assegurar que sua prática seja realizada de forma integrada e contínua com as demais instâncias do sistema de saúde, ***sendo capaz de pensar criticamente, de analisar os problemas da sociedade e de procurar soluções para os mesmos*** (BRASIL, 2002).

[...] Para este fim, os ***mesmos devem possuir competências e habilidades para avaliar, sistematizar e decidir as condutas mais adequadas, baseadas em evidências científicas*** (BRASIL, 2002).

[...] ***os profissionais devem ser capazes de aprender continuamente, tanto na sua formação, quanto na sua prática*** (BRASIL, 2002).

[...] ***conhecer métodos e técnicas de investigação e elaboração de trabalhos acadêmicos e científicos*** (BRASIL, 2002).

O projeto pedagógico do Curso de Graduação em Farmácia deverá contemplar atividades complementares e as ***Instituições de Ensino Superior deverão criar mecanismos de aproveitamento de conhecimentos, adquiridos pelo estudante, através de estudos e práticas independentes presenciais*** *e/ou a distância, a saber:* ***monitorias e estágios; programas de iniciação científica; programas de extensão; estudos complementares e cursos realizados em outras áreas afins*** (BRASIL, 2002).

O Curso de Graduação em Farmácia deve ter um projeto pedagógico, construído coletivamente, ***centrado no aluno como sujeito da aprendizagem e apoiado no professor como facilitador e mediador do processo ensino-aprendizagem****. Este projeto pedagógico deverá buscar a formação integral e adequada do estudante através de uma articulação entre o ensino, a pesquisa e a extensão/assistência* (BRASIL, 2002).

> *[...]* ***abordar as áreas de conhecimento, habilidades, atitudes*** *e valores éticos, fundamentais à formação profissional e acadêmica (...)* (BRASIL, 2002).

> *[...]* ***contemplar a abordagem de temas observando o equilíbrio teórico-prático, desvinculado da visão tecnicista, permitindo na prática e no exercício das atividades a aprendizagem da arte de aprender*** (BRASIL, 2002).

Conforme aponta Marson (2003), vê-se, através das características citadas por alguns organismos nacionais e internacionais, que o estudante deve ser o principal agente do processo educacional, sempre auxiliado pelo professor (que, em conjunto com os monitores, no caso específico desta dissertação, serão denominados orientadores).

Em termos gerais, a visão de aprendizagem apresentada nos excertos mostra que os estudantes devem ser ensinados sobretudo a "**aprender a aprender**" e a "**aprender a transformar informações em conhecimentos**".

1.2. OBJETIVOS DAS AULAS PRÁTICAS

A Bioquímica (BQ) tem grande importância para a formação de diversos profissionais tais como farmacêuticos, biólogos, químicos, médicos, biomédicos, enfermeiros, nutricionistas, odontologistas, educadores físicos, entre outros. Basta verificar que esta disciplina é pré-requisito nos currículos destes cursos de graduação (SILVA, 2002).

Por ser uma ciência essencialmente experimental (VELLA, 1987), a importância da BQ é muito grande, devido ao uso cada vez mais comum de suas técnicas em vários setores da pesquisa científica. Essas técnicas geralmente são ensinadas em disciplinas de BQ, podendo ser modificadas e ajustadas de acordo com a formação específica de cada profissional.

Diversos autores classificaram os objetivos das aulas práticas (ALVAREZ, 2002; AUSTIN, 1997; BOYER, 1987; CORNELY, 1998; DAS; SINHA, 2000; DREISBACH, 1986; FIALHO; ROCHA; MELLO, 1999; GOH; TOH; CHIA 1989; HALL et al., 2003; HENDRICKSON et al., 1995; LEWIS, 1999; MARUCA, 1990; MOZDZIAK; PETITTE; CARSON, 2004; PICH-OTERO et al., 1998; RASCHE, 2004; RIVAROLA et al., 1997; ROBERTS, 2001; STAHELIN et al., 2003; SUELTER, 1982; VYVYAN et al., 2002; WALLERT et al., 2004; WOOD, 1990, 1996). Utilizar-se-á aqui a classificação de Wood (1996), acrescida de tópicos criados pelos outros autores referidos neste parágrafo.

As aulas práticas abrangem três grandes grupos de objetivos.

1. Ilustração da teoria:
   - consolidação de conceitos apreendidos teoricamente;
   - aprendizagem de hipóteses, modelos teóricos e categorias taxonômicas.
2. Desenvolvimento de habilidades manipulativas:
   - ensino de fenômenos através do manuseio e/ou demonstração em equipamentos;
   - manuseio de materiais biológicos;
   - aprendizagem de técnicas clássicas e/ou padrões;
   - aprendizagem da utilização de instrumentos e/ou equipamentos.
3. Desenvolvimento de habilidades cognitivas superiores:
   - planejamento de experimentos;
   - aproximação da pesquisa experimental;

- aprendizagem de como seguir um protocolo;
- observação e registro de dados acuradamente;
- tratamento de dados;
- utilização de métodos estatísticos de tratamento de dados;
- processamento e apresentação de dados, resultados e conclusões;
- validação de ensaios;
- redação de protocolos;
- análise crítica de resultados;
- aprendizagem de busca de literatura científica;
- aprendizagem de leitura de literatura científica
- proposição de experimentos que respondam questões desconhecidas;
- utilização de raciocínio lógico e crítico;
- proposição e testes de hipóteses;
- comunicação de resultados de forma oral e/ou escrita;
- trabalho em conjunto como membro efetivo de grupos;
- compreensão da natureza da ciência:
    - empreendimento científico;
    - existência da multiplicidade de métodos científicos;
    - inter-relações entre ciência e tecnologia.

4. Desenvolvimento de atitudes:
    - curiosidade;
    - interesse;
    - correr risco;
    - objetividade;
    - precisão;
    - confiança;
    - perseverança;
    - satisfação;
    - responsabilidade;
    - consenso;
    - colaboração.

Os objetivos das aulas práticas podem também ser reclassificados utilizando a Taxionomia de Bloom (BLOOM, 1973). Nesta classificação, as diversas habilidades foram agrupadas em três domínios, de acordo com seus objetivos educacionais.

Cada domínio corresponde a uma série de habilidades próprias, porém não indissociáveis umas das outras.

Aulas práticas estão fortemente centradas em habilidades cujos objetivos educacionais recaem no **domínio psico-motor** (objetivos relacionados às habilidades manipulativas ou motoras), preterindo o **domínio cognitivo** (objetivos vinculados às operações intelectuais) e o **domínio afetivo** (objetivos relativos a mudanças de interesse, atitudes e valores e o desenvolvimento de apreciações e ajustamento adequado).

Já Domin (1999) fez algumas considerações sobre os estilos predominantes nas aulas práticas (Tabela 2). Cada estilo pôde ser definido por três variáveis: resultado final dos experimentos, abordagem e procedimento.

Tabela 2 – Estilos de aulas práticas e suas respectivas variáveis

Estilo	Características		
	Resultado	Abordagem	Procedimento
Expositivo	Totalmente pré-determinado	Dedutivo	Entregue
Investigativo	Indeterminado	Indutivo	Realizado pelo estudante
Descoberta	Parcialmente pré-determinado	Indutivo	Entregue
Baseado em Problemas	Parcialmente pré-determinado	Dedutivo	Realizado pelo estudante

O **Estilo Expositivo,** também conhecido como *estilo tradicional* ou *estilo de verificação*, caracteriza-se por um resultado final totalmente pré-determinado dos experimentos. Tanto estudantes como professores sabem o resultado do experimento. Sua abordagem é dedutiva, ou seja, os estudantes aplicam determinados conceitos científicos para verificar sua veracidade. As práticas para a realização desses experimentos são obtidas de uma fonte externa, não sendo desenvolvidas pelos estudantes.

Domin declara que o estilo expositivo é também o mais criticado, devido ao seu caráter pouco exploratório, pois os estudantes não planejam nem validam seus experimentos. Há pouca ênfase nas discussões dos resultados, pois os estudantes perdem muito tempo tentando reproduzir o resultado esperado em detrimento do planejamento e/ou organização dos experimentos. Declara também que as mudanças conceituais são ineficientes.

Os demais estilos, por diferirem do expositivo em uma ou mais características são denominados estilos não-tradicionais.

O **Estilo Investigativo**, ou *estilo investigativo aberto*, tem um resultado final indeterminado tanto para estudantes quanto para professores. Sua abordagem é indutiva, os estudantes devem inferir o conceito científico a partir da observação dos fenômenos. O procedimento para a observação dos fenômenos deve ser planejado pelos estudantes, com o auxílio dos professores.

Tanto o envolvimento quanto a responsabilidade discente nesse estilo são muito maiores que em quaisquer outros estilos. Os estudantes devem formular seus problemas, coletar dados de trabalhos anteriores, elaborar os procedimentos e predizer o resultado da prática realizada.

O **Estilo de Descoberta**, ou *estilo investigativo guiado*, difere em duas características do estilo expositivo. O resultado previsto é conhecido somente pelo professor, fazendo com que seja parcialmente pré-determinado. Isso faz com que a abordagem seja indutiva. Os estudantes elaboram seus próprios conceitos científicos a partir da observação dos fenômenos.

A descoberta faz com que o conteúdo seja administrado de forma personalizada, tornando sua assimilação mais significativa e melhor retida, além de ser interessante do ponto de vista motivacional, pois os estudantes descobrem por si próprios.

O **Estilo Baseado em Problemas** segue o modelo expositivo, com exceção do procedimento ser realizado pelos estudantes e do fato de ser parcialmente pré-determinado. A partir de uma série de problemas iniciais, os estudantes são guiados pelos professores até a resposta final da questão-problema.

Há ênfase no desenvolvimento de hipóteses em detrimento da solução ser ou não correta. Através da aplicação de seus conhecimentos para encontrar a solução dos problemas os estudantes tomam consciência do porquê do experimento e para quê ele se destina.

A comparação entre estratégias e/ou estilos é, por vezes, inevitável. Porém não é interesse desta dissertação hierarquizá-las pela qualidade. O que, de resto, seria improcedente, já que as estratégias e/ou estilos se prestam a tipos diferentes de objetivos educacionais. Silva (2003) evidencia muito bem a complexidade de tal análise:

> *"[...] a priori não tem como fugir desse confronto empírico, pois é por meio dessa análise contrastiva que se observa como, 'o que traz de novo do tradicional', 'como eles se*

complementam'. 'em que eles se diferem', etc. Na verdade, não existem vantagens e desvantagens, cada meio possui as suas próprias características e cumpre cada um a sua função social e cultural."

Pelo levantamento bibliográfico (p. 22-6) realizado fica aparente a contradição entre a reconhecida importância das aulas práticas de BQ e a freqüência de pesquisas que orientem a sua estruturação eficiente.

Silva (2002) aponta que na maior parte das disciplinas de BQ há

um predomínio absoluto de atividades teóricas em relação às atividades práticas

Em sua pesquisa, realizada em 2000, foram analisadas as disciplinas de BQ que compunham a grade curricular de 53 cursos de graduação da área de Saúde[8] em universidades do município de São Paulo. Cerca de 70% tiveram, em sua carga horária, aulas práticas, sendo que nenhuma ultrapassou 40% da carga horária total de cada disciplina.

Dessa forma o pequeno número de aulas práticas em uma disciplina de BQ acaba por gerar um déficit na aprendizagem experimental dos estudantes. Somado a isso, nessas aulas utilizam-se técnicas antigas e desatualizadas, muitas destas fora do contexto do futuro âmbito profissional do estudante. Galembeck (1999) aponta as razões para tais contradições:

- equipamentos de alto custo de compra e manutenção. São utilizados, portanto, equipamentos antigos e/ou ultrapassados;
- reagentes caros, na maioria das vezes importados. Há um grande desperdício desses materiais por estudantes ainda imaturos;
- tempo reservado às práticas geralmente muito pequeno, coincidindo com o que foi apontado por Silva (2002) anteriormente (ilustração da teoria).

Assim a escolha de tópicos a serem abordados nas aulas práticas recai sobre um número limitado de experimentos, porque práticas mais elaboradas são de difícil realização operacional. Comodidade de uso, obtenção de resultados seguros e tradição de utilização também são critérios muito comumente utilizados para a seleção de experimentos.

Somado a isso, há o fato de que os estudantes trabalham em grupos geralmente muito grandes, havendo poucas chances efetivas de manipulação (GALEMBECK, 1999). A falta de experimentos padronizados e testados, nas condições adequadas para cada instituição, limita a amplitude de uma seleção criteriosa de experimentos.

---

[8] Os cursos eram: Biomedicina, Educação Física, Enfermagem, Farmácia, Fisioterapia, Fonoaudiologia, Medicina, Medicina Veterinária, Nutrição, Odontologia, Quiropraxia, Terapia Ocupacional e Tecnologia Oftálmica.

Diante das limitações apresentadas a aplicação das aulas práticas é extremamente prejudicada.

Sob o ponto de vista discente, as aulas práticas são atividades em que se seguem *receitas* (VELLA, 1987). Essa afirmação é confirmada por alguns dos artigos referidos na revisão bibliográfica (p. 22-6) (FIALHO; ROCHA; MELLO, 1999; GALLET, 1998; GORGA, 2000; HERMAN, 1998; HUTCHISON; ATWOOD, 2002; LOKE et al., 2001; PICH-OTERO et al.,1998; ROBERTS, 2001; SINGH, 1999; STAHELIN et al., 2003; WILSON, 1987; WOOD, 1990).

Vella afirma que os laboratórios de BQ acabam se tornando frustrantes e não-produtivos para muitos estudantes, que freqüentemente acham que realizam um trabalho custoso e sem sentido. Aponta que talvez essa sensação seja devida à forma que as aulas práticas são ministradas.

Alvarez (2002) aponta que em aulas práticas ocorre um superdimensionamento nas habilidades manipulativas, preterindo os demais objetivos educacionais.

No desenvolvimento da disciplina a ser aplicada e analisada nesta dissertação optou-se por utilizar elementos dos diversos estilos não-tradicionais. A disciplina assemelha-se muito ao estilo de descoberta, já que os resultados são pré-determinados, mas somente pelos professores. Assim a abordagem é indutiva. Porém as estratégias de ensino desenvolvidas para a aplicação desta disciplina cooptam elementos de outros estilos não-tradicionais, tais como a proposição de problemas e o fato de haver uma simulação de um projeto de pesquisa, que por si só já evidencia o estilo investigativo.

1.3. TEORIAS DE APRENDIZAGEM

O desenvolvimento do projeto descrito nesta dissertação baseou-se na visão construtivista do processo de ensino e aprendizagem. Por construtivismo pode-se definir uma determinada linha das teorias cognitivistas cuja ênfase se dá nos processos da construção de conhecimento.

Giraldo (1996) afirma que as teorias cognitivistas

> *procuram explicar o processo de aprendizagem sob o ponto de vista da Psicologia cognitivista, o qual sustenta que a aprendizagem de material significativo é, por excelência, um mecanismo humano para adquirir e reter a vasta quantidades de idéias e informações de um corpo de conhecimento.*

Por estar inserido nessa linha teórica, no construtivismo considera-se que

> *a cognição se produz por construção, (...) tanto indivíduos como grupos de indivíduos constroem seus conhecimentos atribuindo significados à realidade em que se encontram. Admite-se que as concepções individuais assim como as concepções coletivas do mundo mudam com o passar do tempo.*
>
> *O ensino de ciências, sob um ponto de vista construtivista, leva em conta que a ciência é uma construção humana, cuja estrutura conceitual tem caráter provisório e evolucionário pois, ao longo do tempo, está aumentando e modificando-se; por isso, o construtivismo considera que a aprendizagem das ciências se dá como construção na mente de cada aluno.*

Dessa forma o construtivismo considera que o estudante é o construtor do seu próprio conhecimento. Cabe ao professor a tarefa de facilitação da construção desse conhecimento pelo estudante.

Mas Giraldo afirma que não se conhece como são produzidas as construções dos conhecimentos, sendo propostas teorias construtivistas. No caso desta dissertação, o referencial teórico mais próximo foi a Teoria Sócio-Cultural formulada por Lev Vygotsky (1896-1934). A aprendizagem colaborativa nas aulas práticas está, portanto, alicerçada na concepção sócio-cultural na construção do conhecimento.

Silva (2003) aponta que

> *"(...) para Vygotisky, o desenvolvimento do homem é definido pelas interações sociais e não por princípios meramente naturais e biológicos. Com esta posição teórica, Vigotisky apresenta e inaugura uma outra perspectiva para explicar o desenvolvimento cognitivo humano: a perspectiva sócio-cultural. Ao sustentar tal proposição, ele acabou por se distanciar tanto das teorias funcionalistas e estruturalistas quanto das concepções biologizantes e mecanicistas que até então dominavam a forma de conceber a natureza humana."*

O indivíduo, portanto, desenvolveria suas habilidades cognitivas por meio da interação social com outros indivíduos, seus pares ou mais capazes, num determinado contexto cultural. Para isso Vygotsky lança mão dos conceitos de nível de desenvolvimento real, nível de desenvolvimento potencial e zona de desenvolvimento proximal (ZDP).

Oliveira (1995) afirma que

> *"o **nível de desenvolvimento real** (...) caracteriza o desenvolvimento de forma retrospectiva, ou seja, refere-se a etapas já alcançadas, já conquistadas (...). As funções psicológicas que fazem parte do nível de desenvolvimento real (...) em determinado momento da vida são aquelas já bem estabelecidas naquele momento. São resultados de processos de desenvolvimento já completados, já consolidados."*

Já o **nível de desenvolvimento potencial** caracteriza-se pela

> *"capacidade de desempenhar tarefas **com** a ajuda (...) de companheiros mais capazes. Há tarefas (...)* [que uma pessoa] *não é capaz de realizar sozinha, mas que se torna capaz de realizar se alguém lhe der instruções, fizer uma demonstração, fornecer pistas, ou der assistência durante o processo".*

A autora reforça que

> *"essa idéia é fundamental na teoria de Vygotsky porque ele atribui importância extrema à **interação social no processo de construção das funções psicológicas humanas**. O desenvolvimento individual se dá num ambiente social determinado e a relação com o outro, nas diversas esferas e níveis da atividade humana, é essencial para o processo de construção do ser pscicológico individual."*

Pelas palavras de Vygotsky, a **zona de desenvolvimento proximal** é definida, portanto, como

> *"a distância entre o nível de desenvolvimento real, que se costuma determinar através da solução independente de problemas, e o nível de desenvolvimento potencial, determinado através da solução de problemas sob a orientação (...) ou em colaboração com companheiros mais capazes. (...) A ZDP define aquelas funções que ainda não amadureceram, mas que estão em processo de maturação, funções que amadurecerão, mas que estão presentemente em estado embrionário. Essas funções poderiam ser chamadas de "brotos" ou "flores" do desenvolvimento, ao invés de frutos, do desenvolvimento."*

Um exemplo real de situação em que os postulados de Vygotsky são postos em prática foi dado por Costa e Torres (2004). Em sua pesquisa, os autores monitoraram disciplinas colaborativas, relatando que

> *ao contrário do que ocorre nas aulas expositivas,* [nas aulas em que o ensino colaborativo foi aplicado] ***os estudantes foram encorajados a ajudar uns aos outros, minimizando sentimentos competitivos; o professor não era mais o foco das atenções, porém tornou-***

se um guia e facilitador. O professor ouvia, encorajava a expressão de idéias (...) e devotava sua atenção aos grupos com maiores dificuldades.

1.4. CARACTERÍSTICAS DAS AULAS BASEADAS EM PROJETOS

O desenvolvimento de disciplinas que contemplem as recomendações feitas pelos órgãos nacionais e internacionais, proporcionando o desenvolvimento de habilidades que não somente aquelas derivadas da manipulação dos experimentos, é extremamente desejável.

Buscas específicas nas duas principais revistas da área[9] revelaram uma quantidade muito pequena de artigos tratando de disciplinas baseadas em projetos (Tabela 3).

Dos 30 artigos encontrados, 13 foram publicados entre 2001 e 2004, período no qual o projeto descrito nesta dissertação estava sendo desenvolvido, demonstrando que atualmente existe uma preocupação genuína no desenvolvimento de diferentes currículos.

Grande parte dos artigos descreve iniciativas pessoais docentes. Somente em alguns se evidenciam iniciativas institucionais.

Algumas características das disciplinas podem ser destacadas.

1. Apresentavam aulas teóricas expositivas introdutórias (*lectures*).
2. Cerca da metade apresentava práticas seqüenciais, o que configura uma indicação bastante forte de que as disciplinas eram orientadas por projetos.
3. Entre os artigos que registram o número de estudantes participantes, a maioria descreve aulas para um número reduzido de estudantes. Somente cinco artigos apontaram mais que 50 estudantes em seu corpo discente.
4. Os períodos de aulas variavam em torno de seis horas semanais, incluindo os períodos de aulas expositivas.
5. Havia aulas de treinamento técnico de manipulação antes do início dos projetos propriamente ditos. Consumiam de 30% até 70% do tempo total das disciplinas.
6. Poucos artigos assinalaram discussões ao final dos experimentos.
7. Somente seis artigos (20%) assinalaram a presença de monitores.
8. A maior parte das disciplinas consistiu em um único projeto. Somente duas disciplinas consistiram de mais que um mini-projeto.
9. Aproximadamente 30% dos artigos evidenciaram a avaliação da disciplina, geralmente por meio de questionários padronizados, institucionais ou não,

---

[9] *Biochemistry and Molecular Biology Education* (antiga *Biochemical Education*) e *Journal of Chemical Education*.

respondidos por estudantes e instrutores. Porém, o método de análise dos dados não é explicado, explicitado nem devidamente aprofundado.

10. Apesar disso a grande maioria dos autores afirma a boa performance dos estudantes e os altos índices de aceitação destes.

Um quadro comparativo de diferentes aspectos das disciplinas referidas encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Artigos de disciplinas de projetos, colaborativas ou assemelhadas.

Nome do autor e ano da publicação	Apresentou aulas expositivas (*lectures*)?	Apresentou práticas em seqüência?	Número de estudantes	Períodos de aula por semana	Carga horária total	Aulas de manipulação antes do início dos projetos (% da disciplina)	Avaliações: 1. dos estudantes 2. da disciplina	Detalhes da avaliação da disciplina.	Presença de monitores assinalada?	Número de projetos
SUELTER, 1982	NI	SIM	NI	3h L	84h	SIM (~30%)	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
ROON et al., 1983	SIM	SIM	NI	3h AE+L	NI	NI	1. SIM 2. SIM	Avaliações escritas de estudantes e instrutores.	SIM	Não se aplica, pois não foi aplicado um projeto, mas sim trabalho cooperativo.
DREISBACH, 1986	NI	NI	NI	NI	NI	SIM	1. NI 2. NI	NI	NÃO	NI
BOYER, 1986	NI	NI	NI (grupos de 2 ou pequenos grupos)	NI	NI	NI	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
WILSON, 1987	SIM	NI	NI	NI	NI	SIM	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
BOYER, 1987	NI	NÃO	NI	3h L	42h	SIM (70%)	1. NI 2. NI	NI	SIM	1
MARUCA, 1990	SIM	NI	NI	3 x 50min AE 2 x 4h L	180h	NI	1. NI 2. NI	NI	NÃO	NI
HENDRICKSON et al., 1995	SIM	SIM.	NI	1,5h AE 4,5-6,5h L (aulas em um mês)	120-160h (30h AE 90-130 L)	NI	1. SIM 2. NI	Foram feitas considerações a respeito, mas muito vagas.	NÃO	1
WOLFSON; HALL; BRANHAM, 1996	SIM	SIM	NI	NI	NI	SIM (~70%)	1. SIM 2. NI	Somente comentários superficiais.	NÃO	1
PICH-OTERO et al., 1998	NÃO	NI	40-50 (3 grupos de 5 a 10 estudantes)	NI	NI	NI	1. NI 2. SIM	Avaliação realizada por questionários tipo Likert. Mostrou alta aceitação dos estudantes.	NÃO	NI
HERMAN, 1998	NÃO	NI	NI	NI	NI	NI	1. NI 2. NI	NI	SIM	NI
GALLET, 1998	SIM	NI	32-64 (?) (grupos de 2)	3 h AE 2 x 50min L	70h	NÃO	1. NI 2. NI	NI	NÃO	NI Provavelmente dividido em 4 pequenas partes.

onde : NI = Não Indicado no Artigo; AE = Aulas Expositivas; L = Laboratório; C = Colóquio e (?) = artigo não deixa claro qual o real número.

continua

Tabela 3 – Artigos de disciplinas de projetos, colaborativas ou assemelhadas – continuação.

Nome do autor e ano da publicação	Apresentou aulas expositivas (*lectures*)?	Apresentou práticas em seqüência?	Número de estudantes	Períodos de aula por semana	Carga horária total	Aulas de manipulação antes do início dos projetos (% da disciplina)	Avaliações: 1. dos estudantes 2. da disciplina	Detalhes da avaliação da disciplina.	Presença de monitores assinalada?	Número de projetos
GRAIG, 1999	SIM	SIM	8-12 (separados em grupo de 2 ou 3)	1h AE 2 x 3h L	70h	SIM (70%)	1. SIM 2. NI	NI	NÃO	1
SINGH, 1999	SIM	SIM	NI	50min AE 2 x 2h50min L	~100h	SIM (~70%)	1. SIM 2. NI	NI	NÃO	1
AYDIN et al., 1999	SIM	NI	~135	NI	NI	NI	1. NI 2. SIM	Avaliação da disciplina pelos estudantes e monitores. Bons resultados, porém questionários não são disponibilizados.	NÃO	NI
DAS; SINHA, 2000	SIM	NI	NI	NI	NI	NI	1. NI 2. SIM	Avaliação da disciplina por estudantes e tutores. Porém é pouquíssimo detalhado.	SIM	NI
HASS, 2000	NI	NÃO	126 (grupos de 3 ou 4)	3h L	30h	NÃO	1. NI 2. NI	NI	NÃO	Não se aplica, pois não foi aplicado um projeto, mas sim trabalho cooperativo.
PETERSON; COX, 2001	NI	SIM	NI (pequenos grupos)	NI	NI	NI	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
ROBERTS, 2001	SIM	SIM	17 (não há certeza se em dois semestres ou se em cada semestre)	50min AE 3h L	~60h	NI	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
VALLARINO; POLO; ESPERDY, 2001	NI	NI	NI (não mais que 5 grupos de 2)	4 a 6h	NI	NI	1. SIM 2. SIM	Avaliação por interação próxima aos estudantes, não é afirmado se houve avaliações escritas	NÃO	NI
SMILEY, 2002	NI	SIM	12 (?)	3h L	NI	NI	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
VYVYAN et al., 2002	NI (pelo contexto Não)	SIM	. 75	NI	NI	NI	1. NI 2. NI	NI	NÃO	NI

onde : NI = Não Indicado no Artigo; AE = Aulas Expositivas; L = Laboratório; C = Colóquio e (?) = artigo não deixa claro qual o real número.

continua

Tabela 3 – Artigos de disciplinas de projetos, colaborativas ou assemelhadas – conclusão.

Nome do autor e ano da publicação	Apresentou aulas expositivas (*lectures*)?	Apresentou práticas em seqüência?	Número de estudantes	Períodos de aula por semana	Carga horária total	Aulas de manipulação antes do início dos projetos (% da disciplina)	Avaliações: 1. dos estudantes 2. da disciplina	Detalhes da avaliação da disciplina.	Presença de monitores assinalada?	Número de projetos
PEZZEMENTI; JOHNSON, 2002	SIM (durante o primeiro mês da disciplina)	NI	9 (1º ano) 12 (2º ano) (trabalho individual ou em grupos de 3)	NI	NI	NI	1. SIM 2. NI	NI	NÃO	2
STAHELIN et al., 2003	SIM	SIM	~22 (por semestre)	1h AE 2 x 3h L	105h	SIM (40%)	1. SIM 2. SIM	Dedica uma parte do artigo para explicar as conclusões, porém não explica como chegou nos resultados.	SIM	1
CASPERS; ROBERTS-KIRCHHOFF, 2003	SIM (mas somente na qual os objetivos são explicitados)	SIM	9-18 (por semestre)	2 x 3h L	84h	SIM (40%)	1. SIM 2. NI	NI	NÃO	2
HALL et al., 2003	NI	NI	NI	NI	NI (6 semanas)	NÃO	1. NI 2. NI	NI	NÃO	1
RASCHE, 2004	NÃO	SIM	16 (feita seleção dos melhores currículos) (grupos de 2)	1h C 3h L	48h	NÃO	1. SIM 2. SIM	Foi realizado o teste padrão da Universidade local. Alta aceitação pelos estudantes.	NÃO	1
WALLERT et al., 2004	SIM	NI	15-18 (formandos por ano)	3h AE 3h L (em média)	NI	NI	1. NI 2. SIM	Como *feedback* dos estudantes. Autores não dispuseram dados para maiores discussões.	NÃO	Não se aplica pois artigo relata o desenvolvimento de um curso, não de uma disciplina
MOZDZIAK; PETITTE; CARSON, 2004	SIM	NI	~64 (divididos em grandes grupos)	2h AE 5h L	56h	NI	1. SIM 2. NI	Somente comentários superficiais.	NÃO	NI
FERNÁNDEZ-NOVELL et al., 2004	SIM	NI	24	2 x 1h AE 2 x 2h L	30h	NI	1. SIM 2. NI	NI	SIM	NI

onde : NI = Não Indicado no Artigo; AE = Aulas Expositivas; L = Laboratório; C = Colóquio e (?) = artigo não deixa claro qual o real número.

OBJETIVOS

Nesta capítulo são apresentados os objetivos gerais e específicos que a dissertação pretende investigar.

2.1. OBJETIVOS GERAIS

1. O principal objetivo do projeto foi a criação de uma disciplina prática inovadora, para proporcionar aos estudantes formas de aprendizagem recomendadas pelos órgãos e instituições oficiais, utilizando-se para isso metodologias de aprendizagem ativa e colaborativa.
2. Sendo a proposta a criação de uma disciplina prática colaborativa de BQ, estruturá-la para que se assemelhasse ao desenvolvimento de um projeto de pesquisa, contribuindo para desenvolver, nos estudantes, as habilidades necessárias para esta atividade.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Ensinar os conteúdos específicos das práticas (pormenorizados na seção 3.3.2, p. 33-5).
2. Oferecer para o maior número possível de estudantes uma disciplina estabelecida em um modelo misto, contendo métodos clássicos (com roteiros práticos entregues aos estudantes), e menos tradicionais, como a proposição de discussões antes e após as aulas de laboratório.
3. Criar, otimizar e padronizar experimentos que possam ser usados em diversos cursos básicos de Bioquímica, de forma isolada ou conjunta.
4. Contribuir para o crescimento qualitativo das aulas práticas de Bioquímica, alterando a sua importância no desenvolvimento da capacidade instrutiva das disciplinas.
5. Desenvolver nos estudantes a habilidade de trabalho em grupo, constituído por pessoas estranhas a seus grupos de amizade pessoais, antecipando assim suas vidas profissionais.
6. Estimular a discussão discente por meio das atividades em pequenos grupos promovidas nas aulas.
7. Criar um modelo de disciplinas práticas colaborativas.
8. Oferecer um modelo de estrutura de disciplinas práticas que possa ser aplicado, com as adaptações apropriadas, por outros docentes, de outras instituições e cursos.

MÉTODOS & PROCEDIMENTOS

Métodos & Procedimentos relata a estruturação da disciplina Bioquímica Experimental, exemplificando, quando necessário, os principais processos da sua construção.

M&P atende duas finalidades. A primeira consiste na descrição pormenorizada da escolha, ajuste, montagem, aplicação e avaliação de uma disciplina prática colaborativa simuladora de um projeto de pesquisa.

O segundo fim, conseqüência direta do primeiro, exemplifica a aplicação dos princípios preconizados anteriormente no desenvolvimento da disciplina *QBQ0216 – Bioquímica Experimental*. Os dois fins atenderam aos objetivos da dissertação.

Primeiramente foi feita a **escolha** da disciplina. Num segundo momento, foi realizado um **ajuste** entre os princípios do projeto e as características da disciplina. A seguir foi realizada a **montagem** da disciplina, caracterizada pela criação da proposta inicial de trabalho, das práticas e das estratégias de ensino das aulas. Na **aplicação**, a disciplina foi novamente ajustada, de acordo com seu horário, número de professores, monitores e estudantes. Por fim efetuou-se a **avaliação**.

3.1. ESCOLHA

A escolha da disciplina deve obedecer postulados claros e simples. Há duas regras gerais para a escolha da melhor disciplina.

1. **A carga horária da disciplina não deve ser pequena**. Essa exigência é justificada pelo fato de que, numa disciplina colaborativa, a discussão é um processo importante da aprendizagem. Disciplinas com cargas horárias grandes facilitam este processo, pois as discussões em grupo demandam tempo. As disciplinas com pequena carga horária não estão excluídas da aplicação de metodologias práticas colaborativas, mas, neste caso, as atividades planejadas devem ser criteriosamente escolhidas para que a falta de tempo hábil não seja um obstáculo para o processo de aprendizagem.
2. Especialmente as disciplinas das ciências naturais, nas quais o componente empírico é altamente valorizado, contêm, em seus currículos, componentes teóricos e práticos. Para uma disciplina prática colaborativa há **necessidade de que a carga horária do componente prático seja alta**. Disciplinas cujos currículos tenham componentes práticos pequenos impediriam a aplicação de uma metodologia colaborativa, pois não haveria tempo suficiente para uma simulação de um projeto de pesquisa.

No Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP) a disciplina QBQ0216 – Bioquímica Experimental foi escolhida, pois foi aquela que melhor se enquadrou nas características supracitadas - tinha uma carga horária relativamente alta (120 horas), distribuída em 15 semanas, com oito horas semanais concentradas em um único dia (para a disciplina do período integral). Este horário facilitou a execução de procedimentos práticos longos e que não poderiam ser interrompidos.

Em relação à segunda característica, QBQ0216 era aplicada em paralelo à outra disciplina, *QBQ0215 – Bioquímica: Estrutura de Biomolécuias e Metabolismo* (180 horas semestrais distribuídas em 12 horas semanais, divididos em três períodos de quatro horas), cuja única atribuição era o ensino de BQ *teórica*. Isso fazia com que Bioquímica Experimental diferisse das demais disciplinas do IQUSP, sendo a única *totalmente* dedicada ao ensino prático de Bioquímica.

3.2. AJUSTE

Entende-se por ajuste a adaptação das características intrínsecas da disciplina ao projeto. **O ajuste consiste na adaptação do projeto ao contexto do curso em que a disciplina se insere.**

QBQ0216 fez parte das disciplinas regulares do ciclo básico do curso de Farmácia-Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP). Era ministrada no quarto semestre letivo. Sua carga horária era distribuída de forma diferenciada pelos diferentes períodos – integral e noturno (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição da carga horária nos períodos

Período	Dias	Horários
Integral	Quartas-feiras	8h às 12h 14h às 18h
Noturno	Terças-feiras Sextas-feiras	19h às 23h

A adaptação se faz tomando as principais características da disciplina e os princípios do projeto. A seguir analisam-se eventuais divergências e convergências. Quando há divergências, soluções devem ser estabelecidas.

No caso específico deste projeto, não foram necessários ajustes. Os princípios do projeto consistiram (1) na abordagem experimental da disciplina, ou seja, na simulação de um projeto de pesquisa e (2) na estratégia de ensino prevista, o ensino colaborativo. Já as características inerentes à disciplina são os (1) horários em que seria ministrada, (2) seu conteúdo e (3) as diretrizes curriculares nacionais, neste caso específico, do curso de graduação em Farmácia.

As escolhas quanto ao conteúdo deveriam respeitar duas condições básicas. O conteúdo deveria estar de acordo com o contexto do curso de graduação, nesse caso, o de Farmácia-Bioquímica. Por isto, as escolhas foram feitas com base na ementa da disciplina[10].

As abordagens intrínsecas ao projeto deveriam permitir a ministração do conteúdo, inserindo-o no modelo colaborativo.

3.3. MONTAGEM

Conhecendo a disciplina, seu conteúdo e a forma de trabalho, a próxima etapa consiste na **montagem das práticas e das estratégias de aulas requeridas pelo projeto**. Essa escolha foi realizada em três etapas.

3.3.1. ETAPA 1

Consistiu na **escolha da proposta inicial de trabalho** a ser realizado pelos estudantes. Deveria estar intimamente ligada com a proposição da disciplina. Foi necessário criar um tema amplo de trabalho laboratorial, passível de ser dividido em subtemas. Abordado na forma de uma questão inicial, a resposta a esta pergunta deveria ser obtida obrigatoriamente de forma experimental.

"Como caracterizar e purificar uma macromolécula?" foi a pergunta criada para ser respondida pelos estudantes. A justificativa utilizada vem do fato de as macromoléculas, sejam constitutivas ou indutíveis, estarem presentes ao longo da vida de qualquer organismo, e seu estudo poder elucidar muitos mecanismos que regulam a vida destes.

Concomitante com a escolha da pergunta-tema, fez-se a escolha da macromolécula que seria utilizada e do organismo ao qual essa macromolécula pertencia.

A ***α-glicosidase*** foi a macromolécula selecionada, pois é amplamente conhecida e estudada, além de ser uma enzima, classe também extensamente estudada nos

---

[10] Após a primeira aplicação da disciplina, nova ementa foi elaborada, incorporando conteúdos e princípios cuja necessidade foi revelada pelas avaliações.

cursos de bioquímica. Como a α-glicosidase está presente em diversos organismos optou-se pela levedura ***Saccharomyces cerevisiae***:

- pela **praticidade**. Há grande facilidade em trabalhar com organismos unicelulares, pois, para muitos, sua cultura é fácil e bem padronizada. Além disto, sua utilização traz a oportunidade de inserir no conteúdo da disciplina tópicos de microbiologia, uma forma de trabalhar com interdisciplinaridade e multidisciplinaridade;
- por **questões éticas**. Optou-se por não trabalhar com animais;
- por **aspectos pedagógicos**. Como eucarioto, a levedura é um modelo biológico que pode facilmente ser transposto para células eucarióticas de organismos superiores.

Inicialmente tentou-se utilizar levedura comercial (fermento de pão), mas devido à contaminação com outras espécies de microrganismos, optou-se pela utilização de cinco cepas definidas de *Saccharomyces cerevisiae*: 131, 144, AM9-8B, S14 e S288-C.

3.3.2. ETAPA 2

A segunda etapa consistiu na **criação e desenvolvimento das práticas a serem utilizadas pelos estudantes**. Duas razões direcionaram sua criação e desenvolvimento.

1. **A necessidade de práticas seqüenciais**. Práticas seqüenciais não estavam disponíveis no acervo de experimentos já utilizados nos cursos práticos do departamento. A simples transposição de práticas classicamente utilizadas tornaria impossível a consecução da segunda razão da criação dessas práticas.
2. **Enriquecimento do rol de práticas padronizadas** disponíveis para outras disciplinas, atingindo assim outro objetivo específico do projeto.

As práticas criadas podem ser utilizadas umas ligadas às outras, na forma de uma simulação de pesquisa, **como também isoladamente**, como *práticas-estanque*.

As práticas foram agrupadas em diferentes módulos, de acordo com a sua utilização prevista. Dentro da proposta geral, os módulos de pesquisa contiveram propostas mais específicas, trabalhadas num determinado conjunto de práticas

relacionadas. Cada módulo de pesquisa objetivou o desenvolvimento de habilidades específicas relacionadas àquele conjunto de práticas (Tabela 5). Foram criados quatro módulos:

. **1º módulo**: construção de uma curva de crescimento e dosagens de glicose e etanol em meio de cultura;

. **2º módulo**: caracterização da enzima α-glicosidase por algumas de suas constantes (K_m, V_{max}, K_i e pH ótimo);

. **3º módulo**: alguns procedimentos de purificação de proteínas (precipitação com sulfato de amônio, cromatografias, eletroforese);

. **4º módulo**: identificação da seqüência de um dipeptídeo comercial (simulação de um seqüenciamento de proteínas), estudo de compartimentos celulares (membranas, lipossomos, cadeia de transporte de elétrons) e metabolismo específico de trealase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Práticas e módulos foram criados concomitantemente, selecionando-se técnicas básicas e comumente utilizadas em laboratórios de pesquisa. O nível de dificuldade dessas práticas, de baixo a mediano, condizia com os propósitos de uma disciplina de serviço do ciclo básico. Algumas outras técnicas, julgadas importantes para a formação dos estudantes, foram acrescentadas em virtude das escolhas do projeto.

Foram criadas e padronizadas 20 práticas. A duração de cada prática não era fixa, variando de 30 minutos até oito horas. A divisão do tempo para a adequação das práticas nos horários estabelecidos será analisada na seção 3.4 (p. 43). A Tabela 5 descreve sucintamente as habilidades envolvidas em cada prática, inseridas em seus respectivos módulos.

3.3.3. ETAPA 3

Na última etapa, **as práticas foram inseridas no modelo do projeto**. Diferentes tipos de estratégias de aulas foram desenvolvidos, condizentes com os princípios da aprendizagem colaborativa e com a intenção de simulação de um projeto de pesquisa.

Estruturadas uma em função da outra, compuseram um ciclo. O **Planejamento (P)** precedia as práticas. Na **Manipulação (M)**, os experimentos planejados eram realizados, em laboratório. Os dados provenientes da manipulação eram tratados

matematicamente nas aulas de **Tratamento de Dados (TD)**. Por fim, esses dados eram analisados nas atividades de **Análise dos Resultados (AR)**. Um novo ciclo **P – M – TD – AR** era iniciado com o término do antecedente.

Tabela 5 – Habilidades procedimentais de cada prática

Módulo		Práticas	Habilidades procedimentais
1º	1	Meio de cultura	medidas de massas, volumes e pH
	2	Inoculação em meio de cultura	trabalho em meio estéril inoculação de microrganismos
	3	Curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*	curva de crescimento de microrganismo
	4	Dosagem de glicose	construção de curvas–padrão dosagens colorimétricas
	5	Dosagem de etanol	construção de curvas–padrão dosagens colorimétricas
2º	6	Fracionamento celular	fracionamento celular
	7	Dosagem de proteínas	dosagens colorimétricas
	8	Determinação da atividade enzimática	dosagens enzimáticas determinação de constantes enzimáticas
	9	Caracterização da enzima: K_m e V_{max}	dosagens enzimáticas determinação de constantes enzimáticas
	10	Caracterização da enzima: determinação do K_i	dosagens enzimáticas determinação de constantes enzimáticas
	11	Preparação de tampões	preparação de tampões
	12	Caracterização da enzima: pH ótimo	dosagens enzimáticas determinação de constantes enzimáticas
3º	13	Precipitação com $(NH_4)_2SO_4$	precipitação com sulfato de amônio
	14	Cromatografia	cromatografia de troca iônica
	15	Eletroforese	*SDS-PAGE*[11]
4º	16	Sequenciamento de Proteínas	cromatografia em camada delgada
	17	Membranas	preparação de lipossomos cromatografia de permeação em gel
	18	Cadeia de Transporte de Elétrons	utilização de potenciais de redução na determinação do local de ação de drogas
	19	Regulação do Metabolismo	ativação da trealase fracionamento celular dosagem de proteína determinação enzimática
	20	Tecnologia de Panificação	

[11] *SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio)

Cada módulo de pesquisa conteve de um a três ciclos, dependendo da complexidade da(s) prática(s) trabalhada(s). Em cada ciclo trabalhou-se uma ou mais práticas.

Práticas simples ou relacionadas por um assunto comum, tais como as relacionadas com a caracterização de enzimas, foram agrupadas em uma única aula de manipulação. Isso fazia com que houvesse uma única aula de planejamento, e posteriormente, uma única aula de tratamento de dados e análise dos resultados. Práticas complexas, ou que tratavam de diferentes assuntos, requisitaram aulas próprias, tais como as práticas de eletroforese, cromatografia ou metabolismo de trealase.

No decorrer da disciplina algumas modificações foram implementadas. Foi realizada no início de cada período de aula uma introdução sobre o que seria feito pelos estudantes no período. Essa introdução tinha características diferentes de um colóquio (procedimento habitual em disciplinas práticas), pois não era introduzido qualquer conteúdo novo, mas sim feita uma breve revisão dos conteúdos e práticas anteriores, situando os estudantes para as etapas que seriam trabalhadas no período.

3.3.3.1. AULAS DE PLANEJAMENTO

Como num projeto de pesquisa real, os planejamentos foram realizados ao longo de toda a disciplina. Estas **aulas de Planejamento** precediam uma prática ou um conjunto destas. Sempre eram orientadas por um ou mais problemas cuja(s) solução(ões) se desejavam. Realizadas em salas de aula, as aulas de planejamento não foram aplicadas de forma expositiva, mas colaborativa, utilizando-se grupos de discussão, umas das razões da divisão dos estudantes em grupos e subgrupos (seção 3.4, p. 43).

O total de tempo de cada aula de Planejamento variou de duas a quatro horas. O tempo de duração dependia da complexidade das discussões a serem realizadas, das incógnitas que deveriam ser respondidas experimentalmente e das técnicas a serem utilizadas.

Os conteúdos não intrinsecamente ligados à manipulação são discutidos pelos estudantes nas aulas de planejamento. Cada prática exigia respostas que

deveriam ser obtidas experimentalmente, ou seja, através da execução dos procedimentos em laboratório. Fazia-se necessário que os estudantes soubessem o(s) objetivo(s) da(s) prática(s) que seria(m) realizada(s). As aulas de planejamento, dessa forma, tiveram como meta trazer o mais próximo possível do estudante a realidade da prática científica. A forma escolhida para orientar o planejamento foi a criação de questões diretivas (Planejamentos, Apêndice VI, p. 169, 170-1, 184-5, 194, 206-7, 213, 220-1, 226, 230, 239). A **inexperiência discente** aliada ao **tempo restrito destinado às aulas de planejamento** foram fatores decisivos na escolha desta forma de condução das aulas de planejamento. Uma disciplina prática deve contemplar manipulações de numerosas técnicas, devendo-se equilibrar o tempo dedicado às discussões em aula e os períodos de manipulação. A hipertrofia das discussões tiraria o caráter experimental da disciplina; sua atrofia levaria meramente ao treinamento técnico-manipulativo.

As questões foram separadas em dois grandes grupos. Do primeiro grupo, **Questões para Discussão**, fizeram parte questões gerais pertinentes ao conteúdo teórico subjacente aos experimentos a serem realizados. Essas questões visaram a discussão e o entendimento de conceitos gerais necessários à realização das práticas, por exemplo, carga elétrica de proteínas. O segundo grupo de questões, **Discussão da Prática**, teve por objetivo o estudo específico dos princípios gerais de cada prática a ser realizada, por exemplo, a função da poliacrilamida e do dodecilsulfato de sódio (SDS) numa eletroforese.

Porém o planejamento não se baseava na simples resolução das questões pelos estudantes. Incluía, muito mais importante, as discussões entre estes e os orientadores. A discussão em grupo foi a forma escolhida para o desenvolvimento da capacidade de planejamento dos estudantes, sendo a forma pela qual as informações coletadas e organizadas através das respostas das questões eram discutidas e validadas.

O trabalho de considerar ou não a relevância das informações não foi realizado tão somente pelos estudantes. Coube aos orientadores o papel ativo de guia na busca do entendimento, auxiliando os estudantes durante o planejamento.

A dinâmica do planejamento previa a discussão inicial das questões pelos estudantes. Quaisquer dúvidas ou considerações surgidas eram trazidas para a

discussão com os orientadores, que, portanto, assumiram o papel de assessores mais do que instrutores propriamente ditos.

Em alguns casos atípicos os grupos não solicitaram a presença dos orientadores, cuja estratégia específica foi a intervenção espontânea. Inquiriu-se os estudantes sobre eventuais situações, abordando os conteúdos estudados e, conseqüentemente, certificando-se de que o grupo tinha realizado uma discussão satisfatória.

A organização das aulas de planejamento se fez, portanto, nas seguintes etapas.

1. Os estudantes foram reunidos em grupos. Cada grupo discutiu as questões do planejamento separadamente.
2. Coube aos orientadores direcionar a evolução dos grupos através do acompanhamento regular destes, por meio:

(a) do lançamento de novas questões pertinentes ao assunto estudado;

(b) da reformulação de idéias discentes parcial ou totalmente incorretas e;

(c) da validação, ou não, das hipóteses feitas pelos estudantes.

3. Ao final das discussões nos grupos, se necessário, era realizada uma discussão geral com a participação de todos os estudantes. Essa discussão era necessária somente se algum conteúdo não tivesse sido tratado satisfatoriamente.

Todos os planejamentos propostos seguiram os procedimentos descritos anteriormente. Entretanto, algumas peculiaridades devem ser ressaltadas em relação ao primeiro planejamento realizado pelos estudantes, o **Planejamento Geral**, diferente dos demais. Nesta aula foram introduzidos:

- o conceito da simulação de um projeto de pesquisa como proposta da disciplina;
- o **Problema** e o **Objetivo** relacionados ao tema geral da simulação.
- o tema geral do projeto: *Caracterização e Purificação de uma Macromolécula*;
- o organismo e a molécula a serem estudados;
- a forma de trabalho da disciplina (planejamentos, manipulações, tratamentos de dados e análises dos resultados).

Com os dados e informações em mãos os estudantes puderam responder e discutir as questões diretivas sobre o desenvolvimento de um ***Projeto de Pesquisa***. Ao final dessa aula foi requerido de cada grupo um fluxograma em que deveriam

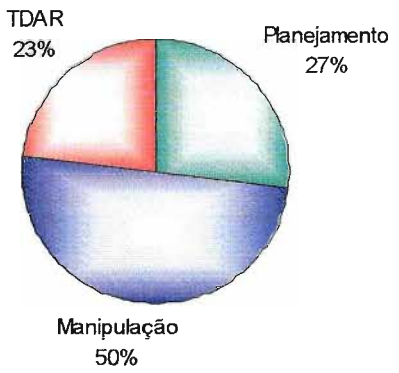
constar as etapas práticas que seriam realizadas pelos estudantes durante o decorrer da disciplina.

Dez aulas de planejamento foram realizadas (Tabela 6), perfazendo cerca de 30% do tempo total da disciplina (Figura 4).

Tabela 6 – Distribuição das aulas de Planejamento

Aula	Conteúdo	Práticas a que se destinaram	Tempo de duração (horas)	Página na Apostila (Apêndice VI)
Geral	Planejamento geral da simulação do projeto	TODAS	4	169
1	Crescimento de microrganismos e dosagens colorimétricas	1, 2, 3, 4 e 5	4	170-1
2	Dosagem de proteína, determinação de atividade enzimática	6, 7 e 8	4	184-5
3	Caracterização de enzimas	9, 10, 11 e 12	4	194
4	Precipitação com sulfato de amônio	13	2	206-7
5	Cromatografias	14	2	213
6	Eletroforese	15	3	220-1
7	Seqüenciamento de proteínas	16	2	226
8	Membranas	17 e 18	3	230
9	Regulação do metabolismo	19	4	239

Figura 4 – Distribuição Total do Tempo – Integral – 2003



3.3.3.2. AULAS DE MANIPULAÇÃO

Seu objetivo principal foi o desenvolvimento de habilidades psicomotoras (BLOOM, 1973). Tomou a maior quantidade do tempo da disciplina, cerca de 50% (Figura 4).

Foram realizadas no Laboratório Didático de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) do IQUSP. Foram realizadas 13 aulas de manipulação, totalizando 20 práticas (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição das aulas de Manipulação

Aulas de Manipulação	Práticas realizadas	Tempo (h)	Página na Apostila (Apêndice VI)
Preparo de meio de cultura*	1	2	174
Inoculação em meio de cultura	2	0,5	175
Curva de crescimento	3		176-7
Dosagem de glicose	4	8	178-9
Dosagem de etanol	5		180
Fracionamento celular	6		186-7
Dosagem de Proteína	7	4	188-9
Determinação da Atividade Enzimática	8		190-1
Caracterização de enzima:			
K_m e V_{max},	9		195-6
determinação do K_i	10	8	197-8
preparo de tampões	11		199
pH ótimo	12		200-1
Precipitação com sulfato de amônio	13	4	208-11
Cromatografia de troca iônica	14	6	214-8
Eletroforese	15	6	222-4
Sequenciamento de proteínas	16	4	227-9
Membranas	17	4	231-3
Cadeia de transporte de elétrons	18		234-7
Regulação do Metabolismo	19	4	240-2
Tecnologia de Panificação	20	4	244-5

*A primeira aula prática foi optativa, sendo facultativa a presença dos estudantes, pois foi realizada fora do horário regular da disciplina.

O papel dos orientadores era o mesmo para as aulas de planejamento, só que multiplicado pelo maior número de grupos (seção 3.4, p. 43). O pequeno número de grupos nas aulas de planejamento facilitava o trabalho docente. Nas aulas de manipulação a razão grupos/orientador crescia, motivo pelo qual a solicitação pelos

orientadores nessas aulas foi maior, acrescida do fato de que a maioria dos equipamentos e aparelhos era desconhecida da maioria dos estudantes.

Os estudantes tiveram à disposição todos os reagentes necessários para os experimentos. Havia volume de soluções-mãe para cada **turma**, de onde os **subgrupos** se serviram (seção 3.4, p. 43). Evitaram-se, assim, grandes desperdícios em acondicionamento de pequenas quantidades de reagentes para cada subgrupo, além de fazer com que cada subgrupo trabalhasse com uma quantidade estipulada de reagentes, para não haver desperdício de material.

3.3.3.3. AULAS DE TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE DOS RESULTADOS (TDAR)

As aulas de tratamento de dados e análise dos resultados consumiram 23% do tempo total da disciplina (Figura 4). Após a aula de manipulação, os estudantes retornavam às salas de aula e finalizavam um ciclo (Tabela 8).

Apesar dos dois tipos de aulas sempre ocorrerem num único período, mesclada uma à outra, far-se-á aqui uma divisão, devido ao fato de que cada tipo de aula destinou-se a diferentes tipos de aprendizagens.

A disposição dos grupos foi exatamente igual à das aulas de planejamento. A finalidade era tratar os dados numéricos provenientes da aula de manipulação, transformando-os em resultados, para posteriormente discutí-los. A dinâmica das aulas de TDAR era semelhante à das aulas de planejamento. Os estudantes discutiram inicialmente, sendo auxiliados pelos orientadores ulteriormente.

3.3.3.3.1. AULAS DE TRATAMENTO DE DADOS (TD)

A primeira parte das aulas de TDAR destinou-se ao tratamento de dados. Os grupos dispunham de dados numéricos provenientes das aulas de manipulação. Cada grupo detinha um conjunto completo de dados, não sendo necessário dados de outros grupos.

O objetivo das aulas de tratamento de dados foi fazer com que os estudantes tratassem seus dados matemática e graficamente, preparando-os para a sua interpretação. Dados puramente numéricos – valores de absorbância,

volumes cromatográficos, distâncias percorridas por solventes e substâncias – foram convertidos em valores analisáveis – massa, concentração, fatores de retenção, porcentagens de incorporação. Sempre quando pertinente os dados eram apresentados de maneira simbólica, na forma de gráficos. Os estudantes tinham a oportunidade de familiarizar-se com programas computacionais adequados para a organização e apresentação de seus dados e com princípios de estatística que orientavam a decisão sobre a confiabilidade dos resultados encontrados.

Tabela 8 – Distribuição das aula de TDAR

Aulas	Conteúdo	Práticas a que se destinaram	Tempo (h)	Página na Apostila (Apêndice VI)
1	Crescimento de microrganismos e dosagens colorimétricas	1, 2, 3, 4 e 5	4	181-3
2	Dosagem de proteína, determinação de atividade enzimática	6, 7 e 8	3	192-3
3	Caracterização de enzimas	9, 10, 11 e 12	4	202-5
4	Precipitação com sulfato de amônio	13	2	212
5	Cromatografias	14	4	219
6	Eletroforese	15	3	225
7	Seqüenciamento de proteínas Membranas	16, 17 e 18	3	238
8	Regulação do metabolismo	19	4	243

Tomando como exemplo as práticas 3, 4 e 5 (p. 176-80), diversos valores de absorbância foram coletados. Os dados numéricos foram então tratados, através de operações matemáticas, sendo convertidos para valores de concentrações de células, glicose e etanol. Para que esses dados fossem convertidos satisfatoriamente, os estudantes construíram curvas-padrão. A seguir gráficos foram construídos, sendo indicadas as concentrações de células de levedura, de glicose e de etanol versus o tempo de incubação.

Vê-se, portanto, que o trabalho despendido nas aulas de planejamento foi parcialmente aplicado nas aulas de tratamento de dados. O estudo teórico das práticas serviu de base para a análise e discussão do melhor tratamento possível para os dados. Utilizando o exemplo anterior, os estudantes estudaram os princípios teóricos de uma curva-padrão. Na aula de tratamento de dados eles aplicaram o conteúdo aprendido numa nova situação.

3.3.3.3.2. AULAS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS (AR)

Ao final do tratamento matemático os estudantes procederam à análise dos resultados. O objetivo da última aula do ciclo era fazer com que estudantes:

1. **observassem acurada e criticamente seus resultados**. Isso fez com que eles classificassem-nos como procedentes ou não, levando assim a exercícios de julgamento;
2. **estabelecessem relações com outros resultados**. Um resultado único nada significava. Era necessária a composição de um quadro, agrupando todos os resultados;
3. **interpretassem os resultados e elaborassem hipóteses que os explicassem frente ao conjunto global de resultados**.

Foi essencial a participação dos estudantes na análise dos resultados, já que nessa etapa um dos objetivos da simulação do projeto de pesquisa se concretizava. A análise crítica, interpretação dos resultados e elaboração de hipóteses constituem as etapas finais e mais importantes do projeto, na qual os estudantes entraram em contato com o universo da pesquisa científica.

3.4. APLICAÇÃO

Nesta etapa **as características variáveis da disciplina devem ser levadas em conta para haver o ajuste aos modelos propostos pelo projeto**, tais como número de estudantes, professores e monitores, e também períodos em que serão ministradas as aulas.

3.4.1. PARTICIPANTES E PERÍODOS DE AULAS

O número de participantes está indicado na Tabela 9. Quanto às aulas, a disciplina do período integral teve aulas ministradas no mesmo dia em dois blocos consecutivos, enquanto no período noturno cada bloco era ministrado em dias diferentes (Tabela 4, p. 31).

A disciplina *QBQ0216 – Bioquímica Experimental* foi aplicada quatro vezes entre 2002 e 2003, para diferentes períodos. Foi aplicada duas vezes para o período integral e duas para o período noturno de Farmácia-Bioquímica. 305 estudantes, sete professores e 11 monitores participaram da aplicação das disciplinas (Tabela 9). Alguns professores e monitores participaram em mais que uma aplicação. Três dos docentes também participaram do desenvolvimento do projeto.

Tabela 9 – Número de participantes das disciplinas aplicadas

	QBQ0216				QBQ2004
Ano	2002	2002	2003	2003	2003
Período	integral	noturno	integral	noturno	férias
Número de estudantes	73	78	77	77	25
Número de professores	2	2	3	2	2
Número de monitores	3	2	5	2	2

Em julho de 2003, o mesmo modelo foi aplicado como disciplina optativa, *QBQ2004 – Bioquímica Experimental: Purificação e Caracterização de Enzimas*. Sua carga horária foi de 60 horas (duas semanas, de segunda à sexta-feira, das 9h às 12h e das 14h às 17h) e possuía características semelhantes à QBQ0216, porém contou com a participação de estudantes de diversas unidades da USP (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição dos estudantes pelas suas unidades de origem

Unidades da Universidade de São Paulo	Quantidades de estudantes
Ciências Moleculares	1
Escola Politécnica	2
Faculdade de Ciências Farmacêuticas	2
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto	1
Faculdade de Saúde Pública	2
Instituto de Biociências	5
Instituto de Matemática e Estatística	1
Instituto de Química	11

3.4.2. DIVISÃO DE TRABALHO

3.4.2.1. DOCENTE (PROFESSORES E MONITORES)

Nas diferentes versões da disciplina houve a participação média de 76 estudantes. Um dos problemas recorrentes enfrentados pelos desenvolvedores foi como adequar o grande número de estudantes sem prejudicar suas aprendizagens. Alguns autores apontam que quanto maior o número de estudantes mais difícil é o trabalho de discussão (AUSTIN, 1997; AYDIN et al., 1999; BOYER, 1986; MOZDZIAK; PETITTE; CARSON, 2004; WILSON, 1987). É um fator preocupante quando aplicado numa disciplina colaborativa.

Como a disciplina contava com dois docentes, a alternativa encontrada foi dividir os estudantes em duas **turmas**, cada uma permanecendo sob a responsabilidade de um docente. Não pôde haver mudança de estudantes de uma turma para a outra. A disciplina do período integral, aplicada em 2003, contou, excepcionalmente, com três docentes, porém um deles teve participação parcial, pois auxiliou o terceiro, que nunca tinha aplicado esse tipo de disciplina anteriormente.

Em relação aos monitores, para as disciplinas do período noturno, cada um responsabilizou-se por uma turma. Para a disciplina do período integral aplicada em 2002 houve adicionalmente um monitor volante. Em 2003 houve cinco monitores, dois fixos em cada turma e um volante. **Com a participação dos monitores, a relação estudantes/orientadores foi bastante reduzida**.

3.4.2.2. DISCENTE

Para cada **turma** foram feitas novas divisões. Conjuntos de nove a 12 estudantes foram reunidos aleatoriamente em um **grupo**. Cada grupo foi identificado pelas letras A, B, C, D, E, F, G e H. Assim, cada turma era formada por quatro grupos.

Cada grupo foi, então, dividido em três **subgrupos**, denominados 1, 2 e 3, de acordo com a letra do grupo: subgrupos A1, A2 e A3 para o grupo A; subgrupos B1, B2 e B3 para o grupo B, e assim por diante. Portanto, cada subgrupo conteve de três a quatro estudantes.

Nas aulas de Planejamento, Tratamento de Dados e Análise dos Resultados, ministradas em sala de aula, as discussões eram realizadas pelos **grupos**. Nas aulas de Manipulação, para proporcionar a oportunidade de trabalho prático a todos os estudantes, os experimentos eram feitos pelos **subgrupos**.

Por esse motivo, em algumas práticas os estudantes trabalharam de forma interdependente. Em procedimentos de maior complexidade, foi necessária a participação cooperativa dos subgrupos que formavam um grupo.

Um exemplo deste trabalho foi realizado nas práticas iniciais da disciplina. Os estudantes tiveram que, ao mesmo tempo:

1. acompanhar o crescimento da levedura (Apêndice VI, Prática 3, p. 13);
2. medir o consumo de glicose no meio de cultura (Apêndice VI, Prática 4, p. 15);
3. medir a produção de etanol no meio de cultura (Apêndice VI, Prática 5, p. 17).

Como estes procedimentos consumiriam muito tempo se todos os subgrupos realizassem todas as práticas, optou-se pela divisão de tarefas. Tomando como exemplo o grupo A, o subgrupo A1 era o responsável pela realização da Prática 3. Os subgrupos A2 e A3, encarregados da Prática 4, dependiam inteiramente do subgrupo A1, pois necessitavam de meio de cultura extraído por esse subgrupo. Tiveram, portanto, que trabalhar coordenadamente para, ao final dos experimentos, obterem todos os dados numéricos para as aulas de TDAR (ver coordenação de todos os grupos e subgrupos: Apêndice VI, p. 9-10).

Um outro exemplo de trabalho cooperativo – desta vez numa única prática - foi praticado no segundo módulo, na determinação da constante de inibição (K_i). A Prática 10 (Apêndice VI, p. 197-8) requeria uma grande quantidade de tempo e material. As tarefas foram divididas pelos subgrupos e cada subgrupo realizou um terço da prática.

É importante frisar que o trabalho cooperativo era realizado somente pelos subgrupos que compunham um grupo (seção 3.3.3.2, p. 40). Assim as discussões eram realizadas dentro do âmbito do grupo que tinha feito as aulas de planejamento e faria as aulas de TDAR.

A divisão de tarefas pelos subgrupos obedeceu à opção pela discussão em grupo (seção 1.3, p. 19-21). Nesses casos cada subgrupo não detinha todas as informações necessárias para a consecução do trabalho. Somente com a discussão

em grupo – cada subgrupo discutindo com e explicando para os outros dois o que tinha sido realizado – o trabalho se completava.

3.4.2.3. FORMAS DE AVALIAÇÃO DOS ESTUDANTES

Como disciplinas regulares do curso de Farmácia-Bioquímica, elas requereram formas de avaliação dos estudantes. Optou-se por relatórios e provas, instrumentos formais de avaliação. Cada grupo entregou um relatório ao final de cada módulo de pesquisa.

Três provas foram aplicadas no transcorrer da disciplina. Abrangeram todo o conteúdo explorado em aula até o momento da aplicação.

Os pesos dados aos relatórios e provas foram crescentes (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos pesos das avaliações

Avaliação	Peso
Relatório 1 – R1	1
Relatório 2 – R2	2
Relatório 3 – R3	3
Relatório 4 – R4	4
Prova 1 – P1	10
Prova 2 – P2	20
Prova 3 – P3	30

Cada avaliação posterior teve maior peso devido à cumulatividade dos conteúdos tratados nas aulas. A média final foi calculada pela média aritmética das somas das avaliações multiplicadas pelos seus respectivos pesos:

$$\text{Média} = [R1 + (R2x2) + (R3x3) + (R4x4) + (P1x10) + (P2x20) + (P3x30)] / 70$$

3.5. AVALIAÇÃO

As avaliações das disciplinas foram realizadas aplicando-se questionários para estudantes, professores e monitores. Todos os questionários constaram de perguntas que requereram respostas dissertativas dos participantes.

Em 2002 foi aplicado o Questionário 1 (Apêndice I) para os estudantes da disciplina do período integral. Constou de 21 questões, quatro delas divididas em itens (três questões foram divididas em quatro itens e uma em três itens), compondo

um total de 32 perguntas. Para o período noturno o Questionário 1 foi modificado (Apêndice II), apresentando 20 questões com 27 perguntas.

Em 2003 foi aplicado um novo questionário para os estudantes da disciplina do período integral, o Questionário 2 (Apêndice III), baseado no anterior, mas reformulado e aprimorado. Conteve 21 questões, com 40 perguntas totais. Não houve condições de aplicar o questionário para a disciplina do período noturno.

Também em 2003 foram aplicados questionários para os docentes e monitores que ministraram todas as disciplinas em ambos os anos. O Questionário 3, para monitores (Apêndice IV), apresentou 14 questões, enquanto o Questionário 4, para professores (Apêndice V), 13 questões.

3.6. OBSERVAÇÕES GERAIS

A versão aqui descrita, com seus exemplos, explicações, descrições e considerações, refere-se, sobretudo, à disciplina integral aplicada em 2003. Justifica-se esta escolha uma vez que, de 2002 a 2003, foram feitos ajustes, correções e modificações na estrutura inicial, chegando-se finalmente à estrutura aqui apresentada.

RESULTADOS & DISCUSSÃO

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Em Resultados & Discussão as principais perguntas dos questionários aplicados para estudantes, monitores e professores são discutidas, comentadas e comparadas, tendo em vista a triangulação dos resultados qualitativos.

R&D é dividida em seis partes. A três primeiras partes referem-se à discussão sobre a simulação do projeto de pesquisa analisado. As três últimas, à análise das aulas de Planejamento e Tratamento de Dados e Análise dos Resultados.

Houve grande participação de estudantes, monitores e professores nas respostas aos questionários. Em média, mais de 90% do total de estudantes matriculados responderam aos questionários aplicados. Nove monitores (dos dez que participaram das aplicações das disciplinas) responderam os questionários, enquanto cinco (de seis) docentes também contribuíram com suas respostas e comentários (Tabela 12).

Tabela 12 – Porcentagem de participantes que responderam os questionários

Participantes	Número de participantes	Número de participantes que responderam os questionários	% de participantes que responderam os questionários
Estudantes (2002-Integral)	73	66	90
Estudantes (2002-Noturno)	78	71	91
Estudantes (2003-Integral)	77	75	97
Monitores	10	9	90
Professores	6	5	83

Para verificar a consecução dos objetivos principais do projeto foram selecionadas para a análise as perguntas consideradas mais relevantes dos questionários. Foram escolhidas 20 questões, sendo seis dos questionários aplicados aos estudantes, sete aos monitores e sete aos professores (Tabela 13).

Foram utilizadas somente as frases e/ou excertos das respostas dos participantes consideradas mais relevantes ou mais explicativas. O intuito foi a exemplificação dos resultados, a fim de facilitar o entendimento de cada pergunta, bem como evitar a repetição indesejável de respostas assemelhadas.

Tabela 13 – Perguntas selecionadas para análise e discussão

Seção	Pergunta	Número do Questionário e a quem se aplicava
4.1	12. As aulas práticas simularam um projeto de pesquisa?	1 – Estudantes
4.2	12A. O que é um projeto de pesquisa?	2 – Estudantes
4.3	12B. A disciplina Bioquímica Experimental simulou um projeto de pesquisa? Justifique.	2 – Estudantes
4.4	12C. Qual a melhor estratégia para as aulas práticas? i. Simulação de um projeto de pesquisa, ii. Práticas independentes umas das outras. Justifique sua escolha.	2 – Estudantes
4.5	12. Você acha que este tipo de disciplina leva a um melhor aprendizado?	3 – Monitores
4.6	1. A forma de conduzir a disciplina (como simulação de um projeto) permite ensinar melhor os estudantes do que as formas convencionais?	3 – Monitores
4.7	10. Como você prefere ministrar um curso experimental? i. Simulação de um projeto de pesquisa, ii. Práticas independentes umas das outras. Justifique sua escolha.	3 – Monitores
4.8	6. Quais as principais vantagens dessa forma de ministrar a disciplina?	3 – Monitores
4.9	7. Quais as principais desvantagens dessa forma de ministrar a disciplina?	3 – Monitores
4.10	13. Você acha que este tipo de disciplina leva a um melhor aprendizado?	4 – Professores
4.11	1. A forma de conduzir a disciplina (como simulação de um projeto) permite ensinar melhor os estudantes do que as formas convencionais?	4 – Professores
4.12	10. Como você prefere ministrar um curso experimental? i. Simulação de um projeto de pesquisa, ii. Práticas independentes umas das outras. Justifique sua escolha.	4 – Professores
4.13	6. Quais as principais vantagens dessa forma de ministrar a disciplina?	4 – Professores
4.14	7. Quais as principais desvantagens dessa forma de ministrar a disciplina?	4 – Professores
4.15	5B. As aulas de PLANEJAMENTO atingiram seus objetivos?	2 – Estudantes
4.16	6C. As aulas de TD+AR atingiram seus objetivos?	2 – Estudantes
4.17	8. As aulas de PLANEJAMENTO atingiram os objetivos propostos?	3 – Monitores
4.18	9. As aulas de TD+AR (TRATAMENTO DE DADOS + ANÁLISE DOS RESULTADOS) atingiram os objetivos propostos?	3 – Monitores
4.19	8. As aulas de PLANEJAMENTO atingiram os objetivos propostos?	4 – Professores
4.20	9. As aulas de TD+AR (TRATAMENTO DE DADOS + ANÁLISE DOS RESULTADOS) atingiram os objetivos propostos?	4 – Professores

PARTE I

RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS DOS ESTUDANTES SOBRE A SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

4.1. AS AULAS PRÁTICAS SIMULARAM UM PROJETO DE PESQUISA? (Questão 12 – Questionário 1)

Um dos principais interesses da avaliação foi verificar a consecução do objetivo que dá nome ao projeto, ou seja, saber se a disciplina simulou um projeto de pesquisa. Para tanto, foram propostas aos estudantes que cursaram a disciplina em 2002 as seguintes questões, que constam do Questionário 1:

"*12. As aulas práticas simularam um projeto de pesquisa?*" (Diurno);

"*11. As aulas práticas simularam um projeto de pesquisa?□ SIM □ NÃO*" (Noturno).

No total, 137 estudantes responderam a questão, sendo 66 do diurno e 71 do noturno. Para analisar os resultados desta questão foram criadas as Categorias I e II, que agruparam, respectivamente, as respostas *Sim* e *Não*. Uma terceira categoria agrupou respostas que não afirmaram nem negaram inteiramente, apresentando uma gradação entre sim e não.

De acordo com as respostas da grande maioria dos estudantes, a disciplina simulou um projeto de pesquisa (Figuras 5 e 6).

Figura 5 – Distribuição das respostas da Questão 12 do Questionário 1 – Diurno (66 estudantes)

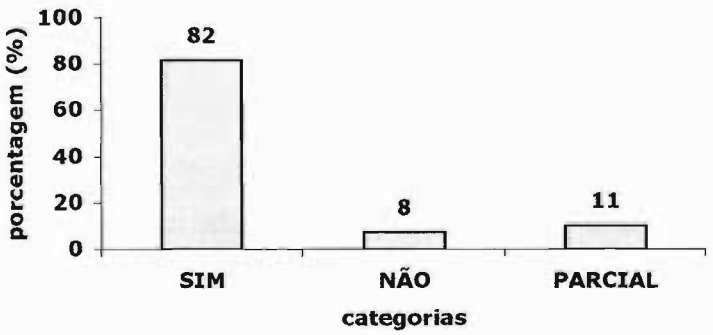
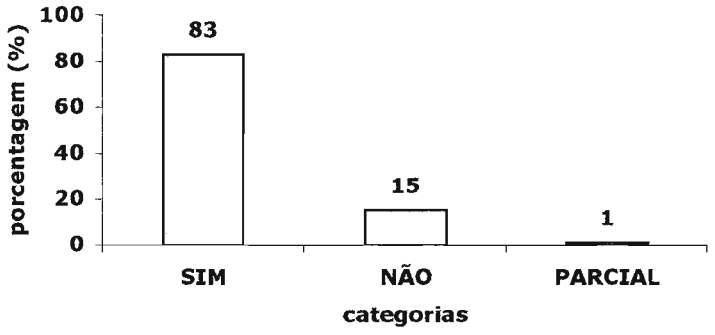


Figura 6 – Distribuição das respostas da Questão 11 do Questionário 1 – Noturno (71 estudantes)



4.1.1. CATEGORIA I – SIM

Dos 137 estudantes que responderam o Questionário 1, aproximadamente 80% (54 do diurno e 59 do noturno) deram respostas afirmativas à questão. Dos estudantes do período diurno que responderam *Sim*, 23 (43% dos 54 estudantes) escreveram algum tipo de comentário. Para a turma noturna esse número foi bastante reduzido, decorrente do fato de que a questão foi aplicada de modo direcionado. Três estudantes escreveram comentários.

Apesar de bastante heterogêneos, foi possível agrupar os comentários em categorias:

1. **Identificação das partes do curso que simularam um projeto e das que não simularam**. Onze estudantes afirmaram que a disciplina simulou um projeto de pesquisa durante uma *parte* do curso.

> *Sim, até o fim do projeto com a α-glicosidase* (1)[1,2].
>
> *Sim, principalmente o isolamento da α-glicosidase* (9).
>
> *Até certo ponto do curso* ***sim*** (16).
>
> *Sim, na sua 1ª parte, e este foi um dos aspectos mais interessantes do curso* (63).

[1] Todas as citações dos participantes foram transcritas literalmente, sem nenhuma modificação gramatical ou no estilo.

[2] Os números ao final de cada frase ou excerto indicam o participante. Os respondentes não se identificaram, mas a cada questionário foi atribuído um número.

Os comentários indicam que os estudantes estiveram atentos à condução do curso. Em seu desenvolvimento houve, de fato, simulação nos módulos I, II e III, e não no módulo IV, como foi descrito anteriormente (Métodos, seção 3.3.2, p. 33-4).

O estudante 4 declarou:

*acho que a primeira parte **sim** mas não sei direito como é um projeto de pesquisa.*

Esta declaração foi um indicativo muito forte para que esta questão fosse modificada para a aplicação no ano seguinte (seção 4.1.4, p.58).

2. **Estímulo do raciocínio**. As declarações são significativas, porque estão associadas ao objetivo da disciplina de fomentar o raciocínio crítico dos estudantes.

Com elas [aulas práticas] *tivemos que pensar, discutir e elaborar possíveis hipóteses para os resultados obtidos* (5).

***O primeiro planejamento** estimulou muito o raciocínio que dirige um projeto* (16).

*Eu **achei muito bom**, pois nos permitiu desenvolver novos pensamentos, **mesmo que não estivessem muito corretos*** (42).

A última parte da declaração do estudante 42 possivelmente referiu-se às aulas de Planejamento e TDAR, em que os orientadores auxiliaram os estudantes nas discussões. A estratégia seguida nessas aulas previa a discussão discente preliminar e posterior auxílio dos orientadores (seções 3.3.3.1 a 3.3.3.3, p. 36-43). A declaração pode estar relacionada às atitudes discentes frente a dados que não puderam ser tratados e a resultados que não puderam ser discutidos. No entender discente esses dados não estariam *muito corretos* (seções 4.15 e 4.16, p. 105-17).

3. **Aspectos relacionados ao método científico**.

***Tínhamos um** objetivo a ser alcançado, **toda uma** teoria por trás do experimento e um procedimento que devia ser seguido à risca* (66).

Isolamos passo a passo a enzima como seria feito no caso do isolamento de uma enzima de processo não conhecido (8).

4. **Respostas diversas**. Os estudantes apresentaram opiniões diversas, algumas divergentes umas das outras.

*Sim, **as aulas simularam um projeto**, pois apresentavam ligação umas com as outras* (45).

Foi isto [a simulação] *que tornou a disciplina interessante* (47).

***A simulação** foi um dos aspectos mais interessantes do curso* (63).

Isso provavelmente se deve ao fato de que a disciplina pode tê-los afetado de maneiras diversas. O estudante 38 afirmou que a disciplina simulou porém

infelizmente. Pois quase nada dá certo.

Outro aponta que só

faltou a real integração entre os pesquisadores [que] *no caso* [seriam] *os estudantes* (41).

O estudante 86 do noturno afirmou que a disciplina simulou,

apesar dos resultados obtidos não serem tão relevantes.

O estudante 49 afirmou

freqüentemente não se ter a sensação de estar trabalhando sobre um assunto comum, e que *isso foi facilitado pelo intervalo de uma aula prática e a seguinte.*

4.1.2. CATEGORIA II – NÃO

Dos estudantes que responderam à questão, 15, cerca de 11%, responderam *Não*. Dos cinco estudantes do diurno somente três fizeram comentários. Dos 11 estudantes do noturno que responderam negativamente um fez comentário.

Acredito que foram boas, mas não chegaram a este ponto [à simulação] (2).

As críticas mais contundentes vêm de dois estudantes:

Não, as aulas práticas eram realizadas num curto período, de forma desgastante e não era possível abordar melhor os resultados obtidos (31).

Não. À medida que os alunos não entendiam, e não sabiam, os rumos que as práticas iriam tomar (...) (57).

A crítica dos estudantes é pertinente, pois se tentou, nesta disciplina, balancear o compromisso entre o desenvolvimento das habilidades pretendidas pelo projeto e a aprendizagem de conteúdos específicos, ou seja, das técnicas básicas de BQ. Nesta disciplina houve a necessidade de uma ampla variedade de técnicas para cobrir os conteúdos requeridos pela ementa. Não se pôde abandoná-las em prol das discussões nem as discussões em prol das técnicas. Os estudantes podem ter entendido isso como uma quantidade muito grande de técnicas num curto período de tempo, fazendo com que a disciplina adquirisse um caráter desgastante.

Somado a isso há que considerar o desconhecimento discente sobre a metodologia de trabalho. A escolaridade prévia dos estudantes privilegia os conteúdos e, mais especificamente numa disciplina experimental, práticas que são confirmações de conceitos explorados em aulas teóricas (ilustração da teoria). Este

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

tipo de escolaridade pode ter dificultado uma aceitação generalizada e imediata da metodologia. Ela foi lenta, gradual, cheia de percalços. E ainda assim alguns estudantes tiveram problemas em entendê-la.

4.1.3. CATEGORIA III - PARCIALMENTE

Somente as respostas de nove estudantes foram enquadradas nessa categoria. Em cinco respostas houve comentários. Não houve nem afirmação nem negação total da simulação, conforme as respostas indicam:

> *um pouco* (6); *não muito* (12); *talvez* (27); *mais ou menos* (30) (62) (107); *dentro do possível* (53); *sim; mais ou menos* (64).

O estudante 134, apesar de não apresentar uma resposta direta, apresentou um comentário pertinente para enquadrá-lo nesta categoria.

> *Muito mecânico, poderia expandir mais, dando exemplos como a técnica pode ser empregada* (134).

Este comentário pode ser explicado pelo fato de algumas técnicas serem utilizadas sucessivas vezes ao longo da disciplina, tal como em uma pesquisa. Na verdade, paradoxalmente, ele indica a semelhança entre os procedimentos adotados na disciplina e os de um projeto de pesquisa.

> *Havia uns experimentos que não relacionaram-se com os anteriores. Não apresentou uma seqüência muito clara* (30).

Conforme mostrado no item 1 da Categoria I (seção 4.1.1, p. 54), a parte final da disciplina não seguiu a seqüência lógica das demais práticas.

> *No início do curso a simulação era melhor, mas causava um certo desinteresse por parte de muitos, que não estavam com vontade de pensar nas possibilidades* (53).

Essa declaração reforça a atitude provável de alguns estudantes frente a uma nova disciplina. O fato de eles não estarem *com vontade de pensar nas possibilidades* indica, pelas observações realizadas no decorrer da disciplina, que a mudança de atitudes desejada, de recepção passiva para discussão ativa, foi muito difícil para os estudantes.

> *No início da disciplina tive a impressão de que tocaríamos o projeto de purificação da α-glicosidase através de pesquisa em livros e auxílio da professora. Mas, na verdade, haviam procedimentos a serem seguidos* (14).
>
> *Faltou análise de resultados (junto com o professor)* (107).

Algumas destas respostas reforçam a discussão feita anteriormente na Categoria II (seção 4.1.2, p. 56): a inexperiência discente frente a uma metodologia de trabalho desconhecida e seus resultados.

4.1.4. REFORMULAÇÃO DA QUESTÃO

Apesar dos resultados das respostas da Questão 12 do Questionário 1 apresentarem alta concordância (cerca de 80%) quanto à simulação obtida na disciplina algumas dúvidas expressas pelos estudantes, aliadas ao fato de ter havido poucos comentários em suas respostas, induziram uma reorganização da questão para o ano seguinte.

O comentário do estudante 4, já mencionado, merece ser destacado (seção 4.1.1, item 1, p. 54)

> *Acho que a primeira parte* [da disciplina simulou] *sim mas não sei direito como é um projeto de pesquisa.*

Esta resposta foi um indicativo muito forte para uma modificação da questão. Aliado ao fato de alguns estudantes terem tido dúvidas sobre o que é um projeto de pesquisa durante o decorrer da disciplina, a questão foi reformulada, sendo incorporadas outras duas perguntas.

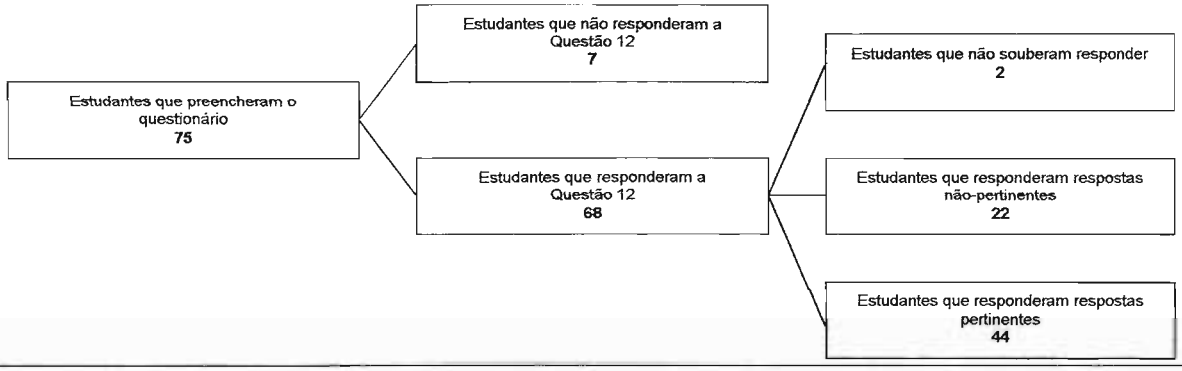
A questão passou a ser composta de três perguntas (Apêndice III, p. 157)

a. *O que é um projeto de pesquisa?*
b. *A disciplina Bioquímica Experimental simulou um projeto de pesquisa? Justifique.*
c. *Qual a melhor estratégia para as aulas práticas.*
   i. *Simulação de um projeto de pesquisa.*
   ii. *Práticas independentes umas das outras.*
   Justifique sua escolha.

4.2. O QUE É UM PROJETO DE PESQUISA?
(Questão 12A – Questionário 2)

A pergunta não foi direcionada. As respostas foram agrupadas em categorias que apontassem uma ou mais características de um projeto de pesquisa. Respostas não pertinentes foram descartadas. Entre os estudantes que responderam a questão houve cerca de 60% de respostas pertinentes (Figura 7).

Figura 7 – Distribuição das respostas da Questão 12A do Questionário 2



As declarações contiveram tanto palavras e/ou frases totalmente explícitas quanto expressões que foram alocadas nas categorias por seu sentido geral. Foram estabelecidas quatro categorias gerais, sendo que algumas foram subdivididas, porém sem a intenção de esgotar todas as possibilidades com subcategorizações minuciosas.

4.2.1. CATEGORIA I – TEMA GERADOR

Das respostas pertinentes, 17 relacionaram-se ao início do trabalho experimental: a proposta original, a idéia iniciadora. Essa idéia foi indicada pelos estudantes de diferentes maneiras, conforme suas frases, palavras e expressões demonstram. Palavras como *hipótese*, *problema*, *idéia*, *proposta* ou *objetivo* são exemplos que expressam esse sentido.

Análise de uma hipótese (4).

É um problema inicial que é esclarecido após experimentos e comparação de dados (27).

Um projeto que parte de uma idéia, procura métodos para desenvolver esta idéia e faz conclusões finais que visam entender se a idéia inicial foi confirmada ou não (37).

É um conjunto de experimentos que elucidarão algo que se tentava descobrir (48).

Elabora-se uma proposta e fazem-se testes para comprová-la (59).

4.2.2. CATEGORIA II – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Esta categoria refere-se à componente prática de um projeto de pesquisa. É interessante notar a indissociabilidade apontada pelos estudantes entre o laboratório e a pesquisa, pois apresentou o maior número de respostas (25).

Planejar os experimentos e determinar empiricamente quais as melhores formas de se obter bons resultados para uma posterior análise (15).

Solução ou análise experimental de um problema teórico proposto (21).

É um projeto que tem como objetivo descobrir algo através de experimentos (22).

É um problema inicial que é esclarecido após experimentos e comparação de dados (27).

Fazer várias experiências sobre um mesmo assunto, estudando-o mais a fundo, tirando conclusões a partir dele (58).

Série de experimentos com seqüência lógica, visando uma conclusão plausível (73).

Algumas frases contêm implicitamente a idéia que representa a categoria, apesar de não conterem palavras específicas.

Elabora-se uma proposta e fazem-se testes para comprová-la (59).

Um projeto que parte de uma idéia, procura métodos para desenvolver esta idéia e faz conclusões finais que visam entender se a idéia inicial foi confirmada ou não (37).

Foi utilizada também a exemplificação.

Partir de uma idéia (por exemplo, melhorar um polímero produzido por uma bactéria) e passar pelo cultivo das células, determinação de todas as propriedades das bactérias e polímeros, sendo analisados todos os aspectos até que se melhore o polímero (60).

4.2.3. CATEGORIA III – CONCLUSÃO

Esta categoria agregou as 17 respostas que indicam as fases finais de um trabalho prático. Sua característica principal é a consecução do objetivo inicial do projeto. É importante notar o sentido de fim apresentado nas respostas dos estudantes. As palavras mais usadas nesses excertos são *conclusão(ões)* e *resultado(s)*.

É um projeto em que se segue uma seqüência para que no fim seja possível concluir algo sobre aquilo que se está pesquisando (10)

Um projeto que parte de uma idéia, procura métodos para desenvolver esta idéia e faz conclusões finais que visam entender se a idéia inicial foi confirmada ou não (37).

Passos que devem ser seguido para se chegar num resultado (conclusão) (54).

É um projeto desenvolvido completamente por um aluno, que o cria, estuda e busca resultados (61).

Porém outras frases também são significativas:

É uma tentativa de se fazer algo novo com algum fim (46).

Nessa mesma frase nota-se também que deve haver alguma finalidade na pesquisa. Há exemplos que comprovam essa visão. Em outros casos, o sentido está implícito.

Série de experimentos com seqüência lógica, visando uma conclusão plausível (73).

Traçar uma meta para alcançar um objetivo (35)

Observou-se também o aspecto inovador da pesquisa, quando os estudantes abordaram a descoberta como um fator importante da pesquisa.

É uma tentativa de se fazer algo novo com algum fim (46).

É um projeto que visa descobrir o funcionamento de algo (66).

É um conjunto de experimentos que elucidarão algo que se tentava descobrir (48).

4.2.4. CATEGORIA IV – HABILIDADES CRÍTICAS

Outro aspecto ressaltado pelos estudantes é o desenvolvimento de habilidades críticas na simulação de um projeto de pesquisa. Diversas frases apontaram esse desenvolvimento crítico.

É um problema inicial que é esclarecido após experimentos e comparação de dados (27).

Visa a projeção, uma visão, uma análise de como será feito uma pesquisa maior. A partir do que dados serão analisados (28).

Um projeto que parte de uma idéia, procura métodos para desenvolver esta idéia e faz conclusões finais que visam entender se a idéia inicial foi confirmada ou não (37).

Ter um objetivo e começar com etapas iniciais, seguidas de outras que tem por fim alcançar esse objetivo. Por fim, conclui-se se o objetivo foi alcançado, se é possível, e analisa-se seu resultado (42).

Dentro dessa categoria cabe ressaltar duas respostas que evidenciam esse processo cognitivo.

Fazer experiências inúmeras vezes, com suas variáveis e analisar os resultados obtidos com a literatura e descobrir possíveis mudanças de procedimento (5).

Planejar os experimentos e determinar empiricamente quais as melhores formas de se obter bons resultados para uma posterior análise (15).

As frases indicam que a pesquisa não é um processo único, de *início – meio – fim*. As mudanças são parte do quotidiano do pesquisador, e é tarefa deste promover *possíveis mudanças de procedimento* e perseguir *as melhores formas de se obter bons resultados*.

Outro aspecto evidenciado nesta categoria é o reconhecimento de que para pesquisar é necessário planejar. As respostas são extremamente claras.

Projeto de pesquisa é a elaboração e planejamento de um estudo direcionado e aprofundado em algum tópico, assunto, etc (8).

Planejar os experimentos e determinar empiricamente quais as melhores formas de se obter bons resultados para uma posterior análise (15).

Um planejamento do que será realizado, protocolo do que será feito e como será o tratamento dos dados obtidos (20).

É um planejamento do que se pretende pesquisar: objetivos, possíveis métodos a serem utilizados (32).

As respostas evidenciam o pensamento discente de que planejamentos são processos realizados antes de um conjunto muito amplo de experimentos, enquanto tratamento de dados e análise dos resultados são realizados após. Apesar dos estudantes terem tido pouco contato com um ambiente real de pesquisa, pois passaram somente por uma disciplina simuladora, é notável que eles saibam que num projeto de pesquisa deve-se percorrer aquelas etapas. Essa categoria reúne indicativos de que a simulação na disciplina foi efetiva, pois descreve, embora de maneira ingênua, o ambiente de pesquisa.

4.2.5. CATEGORIA V - OUTROS

Houve frases que não se enquadraram nas categorias anteriores mas, mesmo assim, foram pertinentes, pois abordaram aspectos importantes da pesquisa.

É estudar a fundo um assunto (34).

Escolher um tema e estudar tudo sobre ele (36).

São projetos que se destinam a estudar a fundo alguma particularidade (?) como uma enzima ou uma via metabólica (67).

(...) pesquisar a ação de algo que você desconhece desde o princípio (3).

4.2.6) RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS

Houve 26 respostas enquadradas em mais de uma categoria. Essas respostas multicategóricas indicaram estudantes que têm um conceito mais completo do que é um projeto de pesquisa, pois apresentaram um maior número de características deste tipo de projeto. Do espaço amostral total dessa questão (75 respostas), as respostas *multicategóricas* perfazem 35%; quando utilizado o espaço amostral útil (44 respostas), perfazem 58%. Seguem as respostas desses estudantes.

1. Categoria 1 + Categoria 2

Quando você tem uma idéia (C1) *e faz vários experimentos* (C2) *para confirmá-la (14).*

Acompanhar desde o início experimentos (C2) *que levariam a um objetivo* (C1) *(24)*

É um projeto no qual se tem um objetivo (C1) *e monta-se uma linha de pesquisa a seguir, com a realização de vários experimentos* (C2) *(45)*

Elabora-se uma proposta (C1) *e fazem-se testes para comprová-la* (C2)*(59).*

Ter um objetivo (C1) *e desenvolver métodos* (C2) *para alcançá-los (72).*

2. Categoria 1 + Categoria 3

Traçar uma meta para alcançar (C3) *um objetivo* (C1) *(35)*

É um conjunto de experimentos que elucidarão algo (C3) que se tentava descobrir (C1) (48).

3. Categoria 1 + Categoria 4

É um problema (C1) *que é dado e você tem que desdobrá-lo* (C4) *(55).*

4. Categoria 2 + Categoria 3

É um projeto em que se segue uma seqüência (C2) *para que no fim seja possível concluir algo* (C3) *sobre aquilo que se está pesquisando (10).*

Pesquisa e fazer o experimento (C2) *para provar* (C3) *(38).*

É uma tentativa de se fazer algo novo (C2) *com algum fim (C3)* (46).

Passos que devem ser seguido (C2) *para se chegar num resultado (conclusão)* (C3) *(54)*

Fazer várias experiências (C2) *sobre um mesmo assunto, estudando-o mais a fundo, tirando conclusões* (C3) *a partir dele (58).*

É um projeto desenvolvido completamente por um aluno, que o cria, estuda e busca (C2) *resultados* (C3) (61).

É de experimentos com seqüência lógica (C3), *visando uma conclusão plausível (73).*

5. Categoria 2 + Categoria 4

Fazer experiências inúmeras vezes (C2), *com suas variáveis e analisar os resultados* (C4) *obtidos com a literatura e descobrir possíveis mudanças de procedimento* (C4) *(5).*

Planejar os experimentos (C4) *e determinar empiricamente* (C2) *quais as melhores formas de se obter bons resultados para uma posterior análise* (C4) *(15).*

Um planejamento do que será realizado (C4), *protocolo do que será feito* (C2) *e como será o tratamento dos dados obtidos* (C4) *(20).*

Um projeto de pesquisa consiste em montar um experimento (C4) *e realizá-lo* (C2), *para analisar o resultado* (C4) *(25).*

É um planejamento do que se pretende pesquisar (C4)*: objetivos, possíveis métodos a serem utilizado* (C2) *(32).*

6. Categoria 1 + Categoria 2 + Categoria 3

Solução (C3) *ou análise experimental* (C2) *de um problema teórico* (C1) *proposto (21).*

É um projeto que tem como objetivo (C1) *descobrir algo* (C3) *através de experimentos realizados* (C2) *(22).*

7. Categoria 1 + Categoria 2 + Categoria 4

É um problema inicial (C1) *que é esclarecido após experimentos* (C2) *e comparação de dados* (C4) *(27).*

8. Categoria 1 + Categoria 2 + Categoria 3 + Categoria 4

Um projeto que parte de uma idéia (C1), *procura métodos para desenvolver* (C2) *esta idéia e faz conclusões finais* (C3) *que visam entender se a idéia inicial foi confirmada ou não* (C4) *(37).*

Ter um objetivo (C1) *e começar com etapas iniciais, seguidas de outras* (C2) *que tem por fim alcançar esse objetivo* (C3). *Por fim, conclui-se se o objetivo foi alcançado* (C4), *se é possível, e analisa-se seu resultado* (C4) *(42).*

Partir de uma idéia (C1) *(por exemplo, melhorar um polímero produzido por uma bactéria) e passar pelo cultivo das células, determinação de todas as propriedades das bactérias e polímeros* (C2), *sendo analisados todos os aspectos* (C4) *até que se melhore o polímero* (C3) *(60).*

4.3. A DISCIPLINA BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL SIMULOU UM PROJETO DE PESQUISA? JUSTIFIQUE.

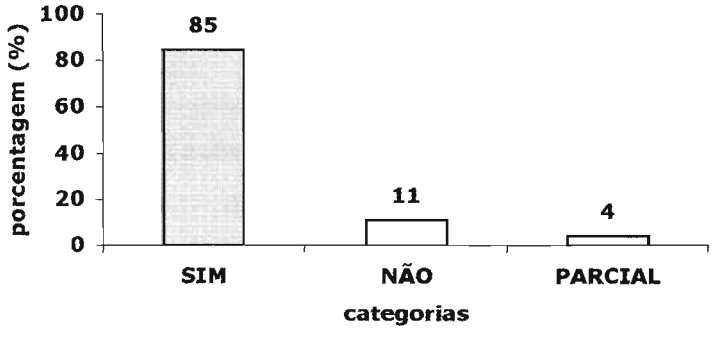
(Questão 12B – Questionário 2)

Para o Questionário 2, aplicado em 2003, um trecho da questão 12 do Questionário 1 foi alterado. "As aulas práticas" foi substituído por "a disciplina Bioquímica Experimental", para que as respostas fossem limitadas somente à disciplina em questão. Além disso, foi requerida uma justificativa, para que houvesse mais material que pudesse ser quanti e qualitativamente melhor analisado.

Como uma pergunta direcionada, os estudantes puderam escolher entre as duas respostas implicitamente sugeridas (Sim ou Não). As respostas que apresentaram características parciais, não se enquadrando nas categorias anteriores, foram agrupadas em uma terceira categoria.

Dos 75 questionários aplicados, três estudantes não responderam a questão. Das 72 respostas válidas, 61 (85%) foram enquadradas na Categoria I (SIM), oito (11%) foram enquadrados na Categoria II (NÃO) e três (4%) foram agrupadas na terceira categoria (Figura 8).

Figura 8 – Distribuição das respostas da Questão 12B do Questionário 2 (72 estudantes)



4.3.1. CATEGORIA I - SIM

Cerca de 85% dos estudantes responderam *SIM*, à semelhança do ano anterior, em que 82% responderam afirmativamente. Dos que responderam SIM houve 44 respostas justificadas, sendo 31 consideradas pertinentes. Da mesma forma que no

ano anterior, as justificativas foram bastante diversificadas, porém foi possível agrupá-las segundo alguns aspectos comuns.

1. **Obtenção de dados e análise de resultados**.

Realizamos diversos experimentos para analisar os resultados e esses puderam ser comparados (1).

Sim, pois discutíamos os resultados e também o porquê de utilizar tais substratos (30).

Simulou, já que foi desde o cultivo de células até a ultra-caracterização da enzima (...), sendo analisados todos os aspectos (60).

(...) Acho que isso simula um projeto de pesquisa, onde devemos obter nossos próprios dados (68).

Sim, colhemos diversos dados em um prazo relativamente curto, que será mais tarde tratado no geral (69).

O estudante 22 alegou como justificativa a elaboração de hipóteses.

Sim, pois analisávamos os experimentos visando a fazer comparações e suposições.

2. **Resultados desconhecidos**.

Em geral sim, pois tínhamos os protocolo e sabíamos qual era o objetivo a ser alcançado apesar de não saber se conseguiríamos (11).

Eu acho que sim. Pois manipulamos os levedos como se não conhecêssemos o resultado (66).

3. **Ajustes de procedimentos**.

Sim. Vários alunos realizaram o mesmo experimento, podendo comparar os resultados e as possíveis falhas de procedimento poderão ser alterada (para melhor) na conclusão do projeto (5).

Sim, pois (...) enfrentamos eventuais problemas que surgiam e aprendemos a contorná-los e depois realizamos tratamento e análise dos dados (15).

Alguns estudantes fizeram críticas à obtenção desses dados, apesar de responderem sim.

Sim, mas houve problemas, por exemplo: práticas que dependiam da prática anterior (que não tinha dado certo), ficavam comprometidas (45).

4. **Seqüência lógica de experimentos**.

Dez estudantes utilizaram como justificativa a seqüência lógica dos experimentos.

Sim, ao longo das aulas tinha uma conexão entre os trabalhos (13).

Sim, pois as práticas tinham dependência entre si (16).

Sim. Foram abordados assuntos uns interligados a outros (23).

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

5. **Clareza dos objetivos no projeto**.

Sim, estabeleciam objetivos de estudo e procedimentos laboratoriais e depois os realizávamos (8).

Em geral sim, pois tínhamos os protocolos e sabíamos qual era o objetivo a ser alcançado apesar de não saber se conseguiríamos (11).

Sim, já que discutíamos sobre o que seria feito, executávamos e depois discutíamos o que foi correto ou não, se obteve êxito ou não (29).

Sim, porque tinha-se um objetivo inicial e todas as etapas tinham por finalidade chegar a esse objetivo (42).

6. **Planejamento**.

Sim, pois em cada prática fizemos um planejamento (...)(15).

Sim, pois analisávamos os experimentos visando a fazer comparações e suposições (22).

Sim, já que discutíamos sobre o que seria feito, executávamos e depois discutíamos o que foi correto ou não, se obteve êxito ou não (29).

7. **Conclusão e/ou solução do problema inicial**, referindo-se aos objetivos iniciais.

Sim, porque tinha-se um objetivo inicial e todas as etapas tinham por finalidade chegar a esse objetivo (42).

Sim. Pois tendo o material de partida chegamos a certas conclusões (54).

8. **Referências para consulta**.

Sim. Temos uma apostila que propõe um método de trabalho para chegar a um objetivo final (49).

Sim. A apostila de um projeto de pesquisa (71).

Sim, pois sempre era necessário buscar comprovação com a literatura (75).

Os comentários citados – análise de problemas, elaboração de hipótese, obtenção de dados, entre outros – compõem um perfil de justificativas apresentadas pelos estudantes. Todas são concernentes a um projeto de pesquisa, até mesmo as críticas. É o caso do estudante 45 (item 3, Ajustes de procedimentos), que mesmo concordando com a pergunta, alegou haver problemas, pois a dependência das práticas prejudicava o andamento da disciplina quando um experimento não

produzia dados tratáveis. A situação apresentada pelo estudante é corriqueira no desenvolvimento de um projeto de pesquisa, extremamente indesejável em aulas convencionais de laboratório, porém em disciplinas de projetos é normal.

O interesse maior, como uma disciplina simuladora, foi fazer com que os estudantes trabalhassem com o inesperado. Como de fato ocorre num ambiente de pesquisa, algumas vezes os dados obtidos geravam resultados totalmente inesperados. Outras vezes os dados não puderam ser tratados ou, quando eram tratáveis, não se encontrava para eles explicações plausíveis.

4.3.2. CATEGORIA II - NÃO

Oito estudantes, 11% do universo de 72, responderam negativamente à pergunta. Cinco justificaram suas respostas. Devido ao pequeno número de respostas e justificativas, optou-se por apresentá-las e comentá-las sem subcategorizá-las, agrupando-as somente quando necessário.

1. A resposta do estudante 56, aparentemente negativa, reforça a consecução do principal objetivo da disciplina

> ***Não, pois as*** *coisas que deram errado na primeira etapa prejudicou as etapas seguintes,* ***não houve a*** *possibilidade de refazer* ***(o que geralmente é feito num projeto de pesquisa).***

O estudante (a) implicitamente abordou a seqüência lógica da disciplina ao afirmar que *as coisas que deram errado na primeira etapa prejudicou as etapas seguintes* e (b) parece conhecer a dinâmica da pesquisa ao mencionar a possibilidade de refazer.

A disciplina não abriu espaços para repetições de práticas cujos resultados não eram "satisfatórios", até porque o foco principal não foi a obtenção de dados que estivessem "corretos", mas sim que possibilitassem a discussão.

Após o tratamento de dados e análise dos resultados (TDAR), era aberta àqueles interessados a possibilidade de repetir a prática fora do horário da disciplina, no laboratório dos docentes responsáveis. Alguns grupos assim procederam, apesar de terem outras atividades e afazeres.

2. O estudante 67 abordou três questões: protocolos, experiência discente e tempo.

> ***Não, pois para realizar um projeto com*** *protocolos tão falhos* ***e*** *alunos que não tem a experiência necessária no laboratório* ***seria*** *necessário o triplo de horas de aula* ***para conseguirmos chegar a resultados satisfatórios.***

A questão do tempo também foi abordada pelo estudante 56. A inexperiência discente é compreensível já que, declaradamente, esta foi para eles uma experiência nova. A inexperiência discente sobre o andamento de um projeto de pesquisa pode ser exemplificada pela declaração do estudante 46:

> ***Não. Num projeto de pesquisa*** *deve-se ter respostas para as perguntas* ***e a*** *Bioquímica Experimental não as apresentou.*

O interesse de Bioquímica Experimental não estava centrado nos dados, resultados e respostas obtidos pelos estudantes, mas sim em seu desenvolvimento cognitivo. A declaração do estudante 46 é coerente porque, de fato, a disciplina não apresentou respostas prontas. Elas deveriam ser trabalhadas e respondidas pelos estudantes.

Provavelmente a dificuldade em responder as perguntas suscitadas pelas práticas deve-se à escolaridade prévia e aos modelos de aulas práticas utilizados em disciplinas anteriores.

As considerações discentes sobre protocolos "falhos" têm origem em dados não tratáveis e/ou resultados não explicáveis. Na ótica discente, dados e resultados "errados" são conseqüência direta de protocolos "falhos".

Os protocolos eram indicativos. Partiam de uma situação geral. Os estudantes deveriam trabalhar as práticas como modelos, ajustando-as e modificando-as de acordo com as suas necessidades.

As Práticas 6 (Fracionamento Celular), 7 (Dosagem de Proteínas) e 8 (Determinação da Atividade Enzimática) (Apêndice VI, p. 186-91) servem como exemplo. O objetivo era obter um lisado de levedura, dosar proteínas nesse lisado e determinar a atividade enzimática. Um modelo de diluição geral foi fornecido aos estudantes através das práticas. Eles deveriam fazer as modificações e ajustes necessários para que os procedimentos de dosagem proteica e determinação da atividade enzimática pudessem ser realizados de acordo com a quantidade de material no lisado, ou seja, deveriam ajustar suas diluições de acordo com a quantidade de enzima que tivessem extraído. Aqueles que realizaram uma extração

melhor deveriam diluir mais suas amostras, aqueles que não conseguiram realizar uma boa extração deveriam diluir menos sua preparação.

4.3.3. CATEGORIA III - PARCIALMENTE

Três respostas foram agrupadas nesta categoria. Dois estudantes justificaram suas respostas, sendo que o estudante 12 respondeu somente *talvez*.

> *Em parte, **pois as últimas experiências não tiveram muita relação com os experimentos em que havia envolvimento das leveduras*** (10).
>
> *Não exatamente como o que vivencio no meu estágio, **pois existem etapas que não são realizadas pelos alunos, deixando uma lacuna.*** (27)

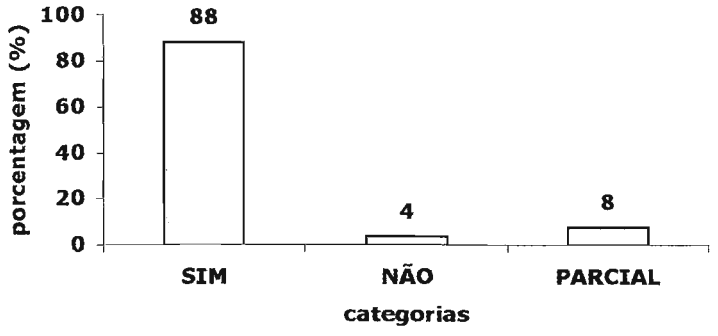
Apesar de apresentarem respostas parciais, suas justificativas reforçam a consecução de uma simulação de um projeto de pesquisa. A primeira frase apresenta uma justificativa semelhante às apontadas pelos estudantes do ano anterior (seção 4.1.1, p. 54). É totalmente pertinente, pois demonstra que o estudante esteve atento à condução da disciplina.

O estudante 27 revelou familiaridade com o ambiente de pesquisa, por estagiar em laboratório de pesquisa. Pertence, também, ao grupo de estudantes cujas respostas são multicategóricas (seção 4.2.6, p. 63-4). Sua resposta é, portanto, pertinente à realidade de um laboratório didático, isto é, **à simulação de pesquisa, não à pesquisa real**. Na estruturação da disciplina, algumas etapas que ocorreriam em situações reais foram suprimidas ou substituídas para adequar o tempo disponível ao conjunto de experimentos a serem planejados, executados e discutidos.

4.3.4. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS

A distribuição das respostas multicategóricas (seção 4.2.6, p. 63-4) foi semelhante à distribuição das respostas do universo total de estudantes que responderam a Questão 12B. Houve 23 respostas agrupadas na Categoria I, uma na Categoria II e duas na Categoria III (Figura 9).

Figura 9 – Distribuição das respostas multicatégóricas da Questão 12B do Questionário 2 (26 estudantes)



As distribuições semelhantes justificam e qualificam **todas** as respostas dos estudantes que responderam às Questão 12 do Questionário 1 (Questão 11 do Noturno) e Questão 12A do Questionário 2. As respostas multicategóricas indicam que estes estudantes constituem um grupo diferenciado, com um conceito mais completo sobre um projeto de pesquisa. Uma vez que suas respostas foram semelhantes às de todos os estudantes, é lícito usá-las para validar a opinião geral dos estudantes que explicitaram com menos detalhes suas concepções sobre projetos de pesquisa.

4.4. QUAL A MELHOR ESTRATÉGIA PARA AS AULAS PRÁTICAS?

I. SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

II. PRÁTICAS INDEPENDENTES UMAS DAS OUTRAS.

JUSTIFIQUE SUA ESCOLHA.

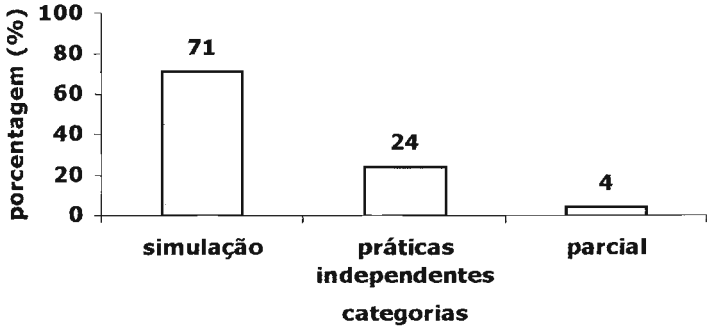
(Questão 12C – Questionário 2)

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

A última pergunta da Questão 12 pediu aos estudantes que optassem pela melhor estratégia entre as listadas. Cada escolha foi, portanto, o ponto de partida para a criação das categorias: I – simulação de um projeto de pesquisa, e II – práticas independentes. Como nas questões anteriores, o direcionamento não foi total, existindo respostas, se bem que poucas, agrupadas na Categoria III.

Dos 75 estudantes que preencheram o questionário, 70 responderam a questão. Optaram pela simulação 50 estudantes (71%), por práticas independentes, 17 (24%). Três optaram pelas duas estratégias, dependendo da situação aplicada a cada uma (Figura 10).

Figura 10 – Distribuição das respostas da Questão 12C do Questionário 2 (70 estudantes)



4.4.1. CATEGORIA I - SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

Pouco mais de 70% dos estudantes optaram pela simulação como melhor estratégia. Somente uma resposta não foi justificada, e somente uma resposta justificada não foi considerada pertinente. Algumas respostas foram agrupadas, à semelhança das questões anteriores.

1. 27 estudantes (54% dos que optaram pela simulação, 38% dos que responderam) apontaram a presença de uma **seqüência lógica** como justificativa pela escolha, expressando-se de formas variadas.

> *Encadeamento lógico* (13).
>
> ***Continuidade do projeto*** *facilita o entendimento geral da teoria, provando que na realidade ocorre um série de acontecimentos* (1).
>
> ***O encadeamento lógico faz com que*** *o entendimento de cada processo fique mais claro* (62).
>
> ***Pois mantém um entendimento lógico,*** *tornando uma prática pré-requisito para outra (não necessariamente com relação do resultado do experimento, mas ao seu entendimento)* (11).
>
> ***A vantagem do encadeamento é a de*** *melhor para aprender do que algo isolado um do outro* (3).

As duas próximas declarações são muito importantes do ponto de vista qualitativo, pois ressaltam aspectos muito difíceis de serem expostos pelos estudantes:

> (...) ***pois*** *percebemos a importância de fazer direito uma etapa* ***pois se não a seguinte não dará certo*** (48).
>
> (...) ***torna a aula mais interessante e esta passa a ter uma seqüência lógica,*** *as coisas não ficam jogadas* (9).

Provavelmente não havia para o estudante 48, até esta disciplina, a noção de que ele deveria *fazer direito uma etapa*. De fato, em aulas independentes, os resultados de um experimento não comprometem o desenvolvimento dos subseqüentes. A tomada de consciência e o desenvolvimento desta habilidade procedimental é, ao mesmo tempo, um dos objetivos da disciplina e um reconhecimento da semelhança dela com a pesquisa científica. Indiretamente, esse tipo de resposta pode indicar o comportamento habitual do estudante em aulas práticas convencionais.

A resposta do estudante 9 pode indicar o grau de entendimento que as aulas práticas anteriores tiveram para ele. Pode-se interpretar *as coisas* de diversas maneiras: a teoria por trás das práticas, os resultados confirmatórios sem quaisquer ligações aparentes, a aplicabilidade prática dos experimentos realizados, entre outros.

2. Alguns estudantes ressaltaram a importância da simulação para a **vida acadêmica profissional**.

Pois para nós é importante termos uma matéria que nos mostra como é realmente o desenvolvimento de pesquisas (15).

Fica mais parecido com o que é feito em um estágio e as práticas acabam tendo uma seqüência e um objetivo claro (19).

Adequa-se a vida real de um cientista (71).

3. Também foi apontado o desenvolvimento do **raciocínio crítico** como conseqüência importante da simulação, além de respostas que indicam o **estímulo ao estudo, à pesquisa e à solução de problemas**.

Para o futuro pesquisador e mesmo para quem não entrará em área de pesquisa, trabalhar com uma seqüência de experimentos encadeados forma pessoas mais "pensantes" (32).

Estimula os alunos a serem mais dinâmicos (30).

Porque se não, não saberemos porque estaremos fazendo a prática (50).

4. Quatro estudantes apontaram a **integralidade da disciplina**.

É mais fácil compreender pela lógica das coisas. Você é obrigado a entender a matéria de modo integral. Se aprende mais usando e analisando (29).

Impede que os alunos "larguem" a matéria (precisa da P1 para entender bem a P19...) e para os sempre interessados dá uma aparência de NOVELA, dá vontade de vir ao laboratório para ver o que vai acontecer (60).

A simulação de um projeto de pesquisa talvez seja mais difícil, mas situa o aluno, cada experiência fará parte de um tema geral (12).

Tem lógica. Em ii [práticas independentes] *depois teríamos que sozinhos tentar relacionar (o que eu não faria)* (20).

5. Apesar de terem optado pela simulação, alguns estudantes fizeram **críticas**.

Acho que as práticas devem ser encadeadas, como foi feito, porém deveríamos fazer "operações" um pouco mais diversificadas e não só medir absorbância e incubar (34).

O estudante 34 abordou a quantidade de determinações enzimáticas e dosagens de proteína realizadas em cada etapa de purificação. Esta declaração, apesar de negativa do ponto de vista discente, é positiva do ponto de vista da prática experimental, pois num ambiente de pesquisa os procedimentos são repetidos rotineiramente.

Os resultados "errados" são recorrentes em algumas declarações discentes:

O único problema é se algo sai errado antes do fim (22).

A simulação é legal, mas como uma etapa depende da outra, é complicado se uma delas dá errado, porque todas as outras também dão errado (...) Se for achada uma solução para esse problema, a simulação é bem melhor (42).

Desde que sejam mais certos os resultados. Ocorreram muito erros (72).

A outra crítica apontada pelos demais estudantes refere-se aos resultados "errados". Os estudantes estiveram sempre em busca de resultados que confirmassem suas práticas, mesmo tendo noção que na disciplina isso não seria realizado. Isso provavelmente deve-se à escolaridade prévia, em que os resultados das práticas são classificados em "corretos" e "errados".

4.4.2. CATEGORIA II – PRÁTICAS INDEPENDENTES

Pouco menos de 25% dos estudantes optaram por práticas independentes umas das outras. Dos 17 estudantes que responderam a pergunta, somente um não justificou. Dos que justificaram, somente uma justificativa não foi considerada pertinente.

1. A grande maioria das respostas trouxe um aparente paradoxo. Suas justificativas, apesar de serem consideradas negativas pelos estudantes, ressaltaram aspectos importantes de um projeto de pesquisa. As justificativas das respostas dos estudantes foram centradas nos **resultados das práticas**.

Práticas independentes, pois se algo dá errado no começo, esse erro vai se prolongar até o final e comprometer as outras práticas (7).

Porque os resultados freqüentemente dão errado, dificultando a próxima prática. Se forem independentes as práticas, esses resultados não interferem na próxima prática (25).

Experimentos isolados não acarretam danos para o próximo experimento (35).

As práticas dependentes umas das outras desestimularam e desanimaram completamente os alunos, pois o primeiro resultado errado piorou todos os seguintes (70).

Outros dois estudantes, apesar de justificarem da mesma forma, apontaram aspectos positivos da simulação.

Práticas independentes, pois se um experimento der errado prejudicará os demais, aumentando o erro, porém a simulação nos faz lidar mais com a realidade, por exemplo, no trabalho (23).

Apesar de ter gostado da simulação, ***acho que práticas independentes são melhores em uma aula prática,*** *pois um erro cometido nas primeiras experiências da simulação tende a se propagar para as outras* (68).

2. Dois estudantes apontaram a **limitação de tempo** como justificativa da escolha por aulas práticas.

É importante que a prática seja concluída no período disponível para o laboratório (64).

Opto por práticas independentes *primeiro por causa do tempo* ***e segundo que quem quiser fazer um projeto de pesquisa que procure uma iniciação científica, como eu fiz*** (67).

A declaração do estudante 67 revela uma concepção que dissocia por completo o ensino da formação científica das disciplinas regulares. Foi exatamente o contrário do que se pretendeu instituir neste projeto.

A análise dessas respostas deve ser articulada com as relativas aos resultados, pois algumas vezes, tendo obtido resultados inadequados, os estudantes usaram horários extra-aula para repetir algumas práticas.

3. A resposta de um estudante é significativa pois aponta um aspecto não assinalado por nenhum outro estudante, e extremamente importante na condução das aulas práticas:

Práticas independentes umas das outras, para que a gente possa aprender o que está fazendo sem correr o risco de, de repente, não ter material para o experimento seguinte (...) (64).

Tentou-se na disciplina limitar a quantidade de reagente disponível, para que não houvesse desperdício e também para que os estudantes pudessem atuar como se estivessem em um laboratório de pesquisa. Para cada turma (12 subgrupos) foi disponibilizada uma quantidade de reagente suficiente para todas as suas práticas acrescida de um adicional de 50% (seção 3.3.3.2, último parágrafo, p. 41). As queixas foram muitas, mas ao longo da disciplina os estudantes tornaram-se um pouco mais conscientes da quantidade gasta de material. Esta limitação foi notada.

4. Demais respostas.

A separação é melhor [pois aborda um] *assunto diferente* (41).

Além de termos aula uma vez por semana (o que sempre requer revisão de onde estávamos, para onde vamos), ***se uma etapa tem problema compromete todo o resto, também acho mais dinâmico práticas independentes*** (52).

4.4.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE

Três estudantes não optaram por simulação ou práticas independentes. Suas justificativas foram vinculadas a finalidades específicas. O estudante 21 justificou que

> *ambas são importantes.*

A simulação serviria à *carreira acadêmica* enquanto as práticas independentes ao *aprendizado de técnicas.*

O estudante 33 ressaltou que

> *não há preparo suficiente para aplicar um projeto,* ***mas*** *práticas independentes também não são eficientes em aprender.*

A crítica mais contundente foi feita pelo estudante 57:

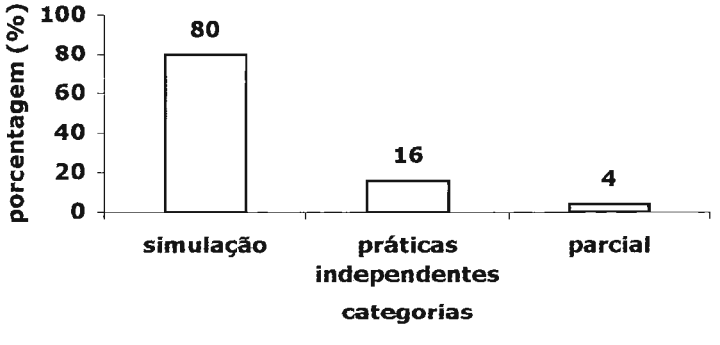
> *qualquer uma, desde que os experimentos ficassem claros e tivessem propósitos claros.*

4.4.4. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS

Da mesma forma que na seção 4.3.4 (p. 70-1), fez-se a distribuição das respostas consideradas multicategóricas (seção 4.2.6, p. 63-4). Assim, dos 25 estudantes (um deles não respondeu a questão), 20 optaram pela simulação, quatro por práticas independentes e um foi enquadrado na Categoria III.

A distribuição das respostas deste grupo (Figura 11) reforça a distribuição obtida para o conjunto total de estudantes (Figura 10, p. 72).

Figura 11 – Distribuição das respostas multicategóricas da Questão 12C do Questionário 2 (25 estudantes)



PARTE II

RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS DOS MONITORES SOBRE A SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

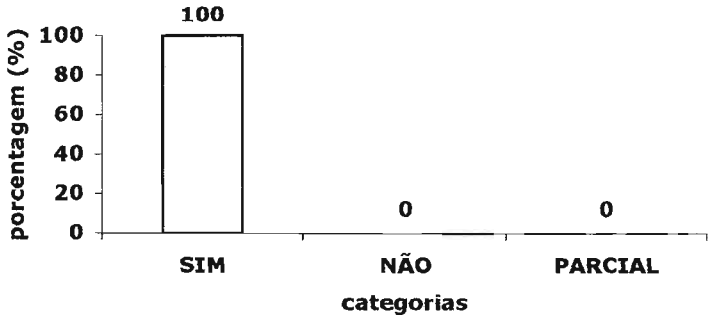
4.5. VOCÊ ACHA QUE ESTE TIPO DE DISCIPLINA LEVA A UM MELHOR APRENDIZADO?

(Questão 12 – Questionário 3)

A questão teve dois objetivos. O primeiro foi explicitado pela pergunta. O segundo consistiu na verificação das justificativas dadas, seguidas de suas eventuais análises, comparando, quando possível, com as respostas dos demais participantes.

Todos os nove monitores responderam afirmativamente a questão. Foram, portanto, enquadrados na Categoria I. Cinco deles apresentaram justificativa. Nenhuma resposta foi alocada nas demais categorias (Figura 12).

Figura 12 – Distribuição das respostas da Questão 12 do Questionário 3 (9 monitores)



Por ser um grupo muito menor que o dos estudantes, não foram criadas classificações pormenorizadas. Comparadas com as respostas discentes, as respostas dos monitores revelaram, como esperado, um maior grau de maturidade acadêmica.

4.5.1. CATEGORIA I – SIM

1. Dois monitores entenderam que a forma de conduzir a disciplina leva a um melhor aprendizado por desenvolver a **capacidade crítica dos estudantes**.

> *Sim, pois com essa metodologia de ensino os estudantes são colocados diante de problemas reais. Com isso, estimula-se o poder de observação, o senso crítico e a tomada de decisões* (2).

Sim. Uma vez que o aluno pensa criticamente, ele é capaz (...) de aplicar esse tipo de pensamento crítico ***em outras disciplinas e assim*** *construir seu conhecimento* (8).

2. Outros dois monitores apontaram algumas razões para o **desenvolvimento da capacidade crítica discente**.

Sem dúvida alguma e acredito ainda que é um dos processos de aprendizagem que mais funcionam, *pois o aluno é a chave para o andamento do curso.* ***E a partir do momento em que o*** *aluno se coloca como o elemento chave e compreende seu papel, há uma evolução significativa no processo de aprendizagem* (1).

Acredito que sim, *pois as práticas são seqüenciais* ***e não*** *independentes como na maioria das disciplinas práticas,* ***o que leva a um maior aprendizado,*** *uma vez que o aluno precisa estar integrado as aulas para não ficar perdido* (7).

3. Apesar de não ser uma justificativa, o monitor 5 relatou um **aspecto primordial da disciplina**, ressaltado em respostas de outros participantes (seção 4.12.1, p. 98 e seção 4.14, p. 102).

Sim. *Este tipo de disciplina pode ser mais trabalhosa, mais complicada de ser implementada e mais desgastante para professores, monitores e alunos. Mas com certeza leva a um melhor aprendizado.*

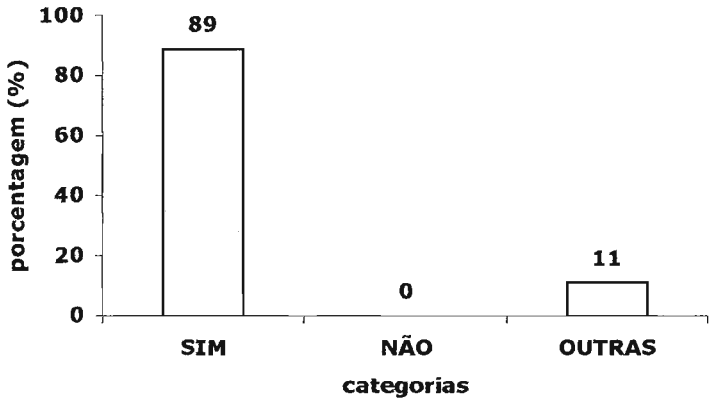
Os adjetivos empregados pelo monitor 5 – *trabalhosa*, *complicada*, *desgastante* – traduzem algumas qualidades desta disciplina. Ela foi, sim, muito mais trabalhosa, pois além de fazer com que os estudantes interagissem numa nova forma, exigiu mudanças de atitudes. Foi *complicada* em relação às discussões e ao compartilhamento de resultados, pois exigiu uma logística de interação entre os grupos, e entre estes e os orientadores. E, certamente, a solicitação e atuação constantes dos docentes e estudantes são mais desgastantes, tanto física quanto intelectualmente, do que as estratégias convencionais.

4.6. A FORMA DE CONDUZIR A DISCIPLINA (COMO SIMULAÇÃO DE UM PROJETO) PERMITE ENSINAR MELHOR OS ESTUDANTES DO QUE AS FORMAS CONVENCIONAIS?

(Questão 1 – Questionário 3)

Oito monitores responderam afirmativamente à questão. Suas respostas foram enquadradas na Categoria I, enquanto a de um monitor foi alocado na Categoria III (Figura 13). Três monitores não justificaram suas respostas.

Figura 13 – Distribuição das respostas da Questão 1 do Questionário 3 (9 monitores)



4.6.1. CATEGORIA I – SIM

1. Algumas características da disciplina foram apontadas pelos monitores para justificar suas preferências, tais como o **incentivo à resolução de problemas** e a **seqüência lógica das práticas**.

> *Sim, **este modo de ensino** incentiva o aluno a resolver os problemas de acordo com o que é aprendido **durante o curso,** sempre aprofundando o conhecimento* (3).
>
> *(...) **Na disciplina em que eu fui monitora tive a impressão de que certos** conceitos estão muito mais sedimentados **e claros porque o próprio** aluno teve que desenvolver o projeto e encadear as práticas de uma maneira lógica* (5).

Na opinião do monitor 9, a seqüência lógica motiva os estudantes

> *Sim, **pois quando você coloca nas mãos dos alunos** um projeto de pesquisa com começo, meio e fim, **onde os** conceitos têm sentido palpável, ou melhor, realizável os alunos se vêem estimulados a aprender.*

2. O monitor 1 justificou a **maior participação dos estudantes** como melhor forma de ensiná-los.

> ***Sim. Dentre os fatores que distinguem o modo como esta disciplina é conduzida (...), pode ser destacada*** *uma maior participação do aluno como ser pensante* ***e*** *sua necessidade de pensar e entender o projeto, planejando-o, tratando os dados e analisando os resultados, conseqüentemente o aluno apreende mais e melhor.*

3. **Comparou-se as formas de ministrar aulas práticas**, apontando uma grande vantagem da simulação:

> ***Sim, uma vez que*** *nos métodos convencionais a forma de aprendizado está limitada aos experimentos que "dão certo".* ***Já*** *com a simulação há duas possibilidades de aprendizagem: quando os experimentos dão certo e quando dão errados.* ***Essa última forma de aprendizado*** *estimula a discussão e com isso enriquece as aulas* (2).

Da mesma forma que os estudantes, nota-se também a visão dicotômica, pelo menos para o monitor 2, em que os resultados são classificados como "certos" ou "errados", originada e mantida pela condução convencional de aulas práticas.

4. A monitora 5 justificou sua resposta, fazendo uma comparação entre práticas independentes e simulação, a partir de sua experiência como estudante e orientador.

> ***Eu acho que sim.*** *Quando eu era aluna de graduação eu tive uma disciplina semelhante em termos de conteúdo, mas conduzida de maneira convencional e não me lembrava basicamente de nada estudado na disciplina. Na disciplina em que eu fui monitora tive a impressão de que certos conceitos estão muito mais sedimentados e claros porque o próprio aluno teve que desenvolver o projeto e encadear as práticas de uma maneira lógica* (5).

4.6.2. CATEGORIA III – OUTRAS CONSIDERAÇÕES

1. A resposta do monitor 9 foi alocada na Categoria III, pois, diferentemente das respostas taxativamente afirmativas de seus pares, ele afirmou; *não sei se seria ao certo a palavra ensinar melhor.* Apesar disso, apresentou diversas justificativas que apóiam as idéias dos monitores.

> *(...)* ***Acredito que os alunos podem ter uma*** *visão melhor do porque estão fazendo a aula de laboratório,* ***tendo um objetivo final. Sendo as aulas práticas uma simulação de um projeto de***

pesquisa, os alunos já sabem inicialmente que *existe um objetivo inicial e que existem etapas para alcançar esse objetivo.* ***Em resumo, o que eu quero dizer é que*** *existe uma lógica seqüencial nas práticas,* ***e*** *cada uma é um degrau,* ***nas quais os alunos aprendem as técnicas bioquímicas e complementam o aprendizado adquirido em sala de aula.*** *Essa abordagem acredito que seja melhor para um aprendizado crítico dos alunos.*

4.7. COMO VOCÊ PREFERE MINISTRAR UM CURSO EXPERIMENTAL?

I. SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

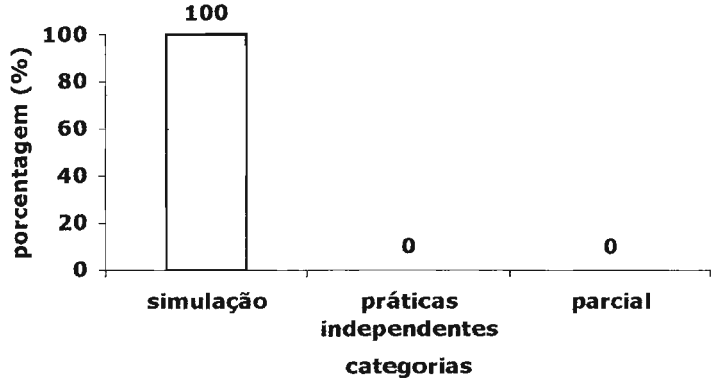
II. PRÁTICAS INDEPENDENTES UMAS DAS OUTRAS.

JUSTIFIQUE SUA ESCOLHA.

(Questão 10 – Questionário 3)

As respostas desta questão permitem verificar a opção geral de escolha adotada, levando em consideração parâmetros tais como aproveitamento dos alunos, aumento do trabalho dedicado à preparação e ao desenvolvimento da disciplina, etc. As respostas indicam que todos os monitores optaram pela simulação de um projeto de pesquisa ao invés de práticas independentes (Tabela 14). Somente o monitor 5 não apresentou justificativa.

Figura 14 – Distribuição das respostas da Questão 10 do Questionário 3 (9 monitores)



4.7.1. CATEGORIA I – SIM

1. Alguns monitores apresentaram em suas justificativas alguns aspectos relativos aos **resultados advindos** da simulação de um projeto de pesquisa.

> *Pois é uma forma de estimular o aluno pensar, acabar com a suposição de que os tópicos vêm em bloquinhos e que não há nada que os unam. Dar a chance de estabelecer relações. E pelo estímulo que é acompanhar o desenrolar, por exemplo, de um sistema como a levedura* (9).

2. Os resultados advindos da simulação estão fortemente ligados, na visão dos monitores, à **aplicabilidade dos conhecimentos adquiridos na disciplina**.

Como dito, em um curso que contenha uma simulação de um projeto de pesquisa, o aluno passa a participar efetivamente já que dele, de seu trabalho e de seus resultados é que se formarão as aulas futuras (...) (1).

A simulação de um projeto de pesquisa apresenta a vantagem de conectar os conhecimentos aprendidos com o decorrer das aulas, o que dificilmente ocorre com aulas cujas práticas são independentes (2).

Apesar de ser a primeira vez que fui monitora de um curso experimental acho que a simulação de um projeto de pesquisa é melhor, pois desta maneira é mais fácil para o aluno aplicar conceitos aprendidos anteriormente (...) (3).

3. O **estímulo e desenvolvimento de um pensamento crítico** foi outro aspecto abordado.

Ajuda o aluno a entender a prática de forma coesa, também estimula o raciocínio lógico, prática fundamental num laboratório de pesquisa (4).

Porque acredito que seja mais fácil para o aluno ter uma seqüência lógica de práticas, com um pensamento crítico sobre elas e aplicando os conhecimentos adquiridos na sala de aula, do que ter práticas independentes apenas relacionadas com o conteúdo de uma disciplina de bioquímica (8).

4. Apesar de preferir a simulação, o monitor 7 fez uma **crítica** à disciplina.

As práticas como são seqüenciais tornam a disciplina mais interessante, no entanto se o grupo comete um erro, este se propaga pelos experimentos pois não existe tempo para repetir os experimentos como num projeto de pesquisa.

A questão do tempo também foi criticada pelos estudantes (seção 4.4.2, item 2, p. 75-6). Como explicado anteriormente, não se quis, durante a construção da disciplina, alocar períodos em que os estudantes pudessem repetir as práticas cujos resultados foram "errados", pois não era intenção da disciplina obter resultados "certos" ou "errados", mas fazer com que os estudantes trabalhassem com os "seus" resultados.

Foram tentados ajustes para que essas situações não ocorressem. Mas fica aqui uma questão: como fazer os estudantes trabalharem com o inesperado, superando o desafio encontrado, sem que os dados, resultados e respostas sejam incertos?

5. Outros trechos e/ou respostas destacaram características diversas presentes em uma simulação.

Melhor visão da bioquímica como um todo. *A disciplina torna-se mais interessante para os alunos* (6).

(...) ***e mais importante,*** *o aluno passa a ter compreensão de seu papel tanto individual quanto em grupo na criação e execução de projetos a médio e longo prazos* (1).

(...) ***além de ser um incentivo ao aluno, que fica*** *mais interessado e mais atento ao que faz durante os experimentos,* ***uma vez que o que ele faz em uma aula será utilizado na próxima aula*** (3).

4.8. QUAIS AS PRINCIPAIS VANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA?

(Questão 6 – Questionário 3)

Todos os monitores responderam a questão. Criou-se quatro categorias. A última agregou as respostas não enquadráveis nas anteriores. Devido ao pequeno número de respostas, algumas vezes uma categoria conteve uma única resposta.

Nota-se nas respostas, em maior ou menor grau, a valorização de a disciplina ter práticas em uma seqüência lógica, havendo o estímulo das habilidades críticas dos estudantes pela sua participação efetiva nos planejamentos, tratamentos de dados e análises dos resultados.

4.8.1. CATEGORIA I – ESTÍMULO À HABILIDADES CRÍTICAS

Quatro monitores apontaram, em suas respostas, o **estímulo a habilidades críticas**.

> (...) ***os alunos*** *são incentivados a pensar,* ***as técnicas*** (...) *não são dadas "mastigadas"* ***para os alunos, eles conseguem entender porque precisam aprender as técnicas, e no final são capazes de por em prática o que aprenderam*** (3).
>
> *Exige do aluno maior participação e raciocínio,* ***não somente devido ao tema estudado, mas também na questão de organização dos experimentos.*** *Apesar do método induzir as práticas que na verdade já estão planejadas, ele faz com que o aluno chegue no plano desejado de forma espontânea e participativa* (4).
>
> (...) ***as principais vantagens que eu vejo são:*** *uma melhora no pensamento crítico dos alunos,* ***uma vez que eles têm que tratar os dados obtidos em uma prática para iniciar outra;*** *saber que o prosseguimento do seu trabalho (alcançar seu objetivo final) depende de uma escolha correta em todas as etapas* (8).
>
> *Os alunos elaboram e discutem mais o projeto e não atuam como simples executores das práticas.* ***Além disso, os alunos ficam mais preparados para as dificuldades do dia a dia da bioquímica experimental.*** *A noção de que experimentos podem dar errado e que existe um motivo para isso ter acontecido e que são eles que devem entender a razão pela qual o experimento não deu certo se torna clara para o aluno ao longo do curso* (5).

4.8.2. CATEGORIA II – PARTICIPAÇÃO DISCENTE

Um importante aspecto ressaltado foi a **participação discente** nesse tipo de disciplina.

> *Como dito, o aluno passa a ter maior contato com a disciplina já que este deve preparar uma estratégia a cada dia,* ***o que envolve criação de um protocolo de pesquisa, a preparação e a execução de ensaios práticos e obtenção e análise dos resultados.*** *O mais interessante envolve a utilização dos resultados na preparação de aulas futuras, "obrigando" o aluno a estar sempre presente e atento a cada passo do curso* (1).
>
> ***Creio que a principal vantagem da metodologia proposta é*** *a maior participação dos alunos nas aulas.* ***Isso fez com que o tradicional monólogo do professor fosse substituído pela discussão entre alunos professores e monitores, que por sua vez*** *trouxe à tona uma série de questões relativas à matéria que dificilmente seriam levantadas em disciplinas ministradas à maneira tradicional* (2).

4.8.3. CATEGORIA III – SEQÜÊNCIA LÓGICA

O monitor 9 apontou a **seqüência lógica** como vantagem.

> *A seqüência de acontecimentos que não permite ao aluno fazer as coisas pela metade, ou de qualquer jeito, pois a etapa seguinte precisa do passo anterior. Assim o conhecimento acaba tendo uma base sólida,* ***o aluno entra em contato com um conceito e faz uso dele no decorrer do curso somando outros mais pelo caminho*** (9).

Pode-se relacionar esta resposta ao depoimento dos estudantes: (seção 4.4.1, item 4, p. 74) a seqüência faz com que as práticas não fiquem desconectadas, fazendo com que os estudantes tenham que acompanhar todas as práticas.

4.8.4. CATEGORIA IV – DEMAIS RESPOSTAS

> *Acho que o interesse dos alunos foi maior* (6).
>
> *Mostrar ao aluno como se planeja e executa um projeto em qualquer laboratório de pesquisa* (7).

4.9. QUAIS AS PRINCIPAIS DESVANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA?

(Questão 7 – Questionário 3)

Todos os monitores responderam a questão. Seu objetivo foi saber quais as características consideradas negativas pelos monitores e suas eventuais justificativas, na tentativa de um estabelecer pontos comuns entre as suas respostas e as dos estudantes. Foram criadas quatro categorias, se bem que, como no caso anterior, algumas vezes uma categoria conteve somente uma frase.

4.9.1. CATEGORIA I – MOTIVAÇÃO DISCENTE

Cinco monitores apontaram a **motivação dicente**, abordando aspectos desmotivadores da disciplina, e justificando os eventuais motivos para tal desmotivação.

> *Talvez a principal desvantagem seja uma dificuldade intrínseca em manter e gerar curiosidade nos alunos, visto que é um curso que irá depender exclusivamente do trabalho feito por eles* (1).
>
> *Vejo apenas um problema nesse tipo de metodologia: a dificuldade que surge em determinados momentos de motivar o aluno a realizar os objetivos propostos. Muitas vezes os alunos faziam queixas à respeito da falta de "resultados positivos" ao final do experimento. Apesar de tal problema não ser propriamente uma desvantagem, talvez seja necessário refletir sobre o que fazer para despertar a motivação dos alunos* (2).
>
> *Algumas vezes os alunos ficam desanimados porque seus experimentos não deram certo* (...). *Lidar com esse tipo de insatisfação é bastante complicado e difícil* (5).
>
> *Muitas vezes o projeto de trabalho não atinge os objetivos pretendidos, o que é muito frustrante* (...) (6).
>
> *Quando o aluno não chega em um resultado satisfatório, ou seja, se o experimento não dá certo, gera uma certa desmotivação no grupo. E como, principalmente nas primeiras aulas práticas, uma era continuação da outra, os erros vão se acumulando. O que observei nesse momento foi uma certa aversão dos alunos pela disciplina quando os resultados não eram bons* (7).

O ponto principal das justificativas apontadas é a dificuldade em reverter as várias situações desmotivantes. Considerando os comentários dos estudantes e as observações realizadas durante a aplicação da disciplina, na maior parte das vezes

essas situações instalam-se quando há erros na condução dos experimentos. Este problema precisa ser pelo menos atenuado, mesmo considerando que o principal objetivo da disciplina era habilitar os estudantes a discutir os resultados, ainda que discrepantes dos considerados "*corretos*".

Uma possível solução seria minimizar os erros na condução dos experimentos. Aulas de leitura dos roteiros das práticas seria uma solução. Mas como fazer isso sem que boa parte do tempo da disciplina se transforme em enfadonhas aulas de leitura? Outra solução seria alocar tempos "intraclasse", em que os estudantes pudessem realizar novamente as práticas em que houve "erros".

Duas possíveis conseqüências negativas imediatas seriam sentidas:

- o conteúdo da disciplina teria que ser reduzido.
- muito mais importante, o currículo oculto da disciplina seria centrado no interesse dos resultados corretos, e não na discussão da pertinência dos dados, resultados e respostas.

A conscientização discente não é rápida, mas sim lenta e gradual. Não é possível esperar que comportamentos assimilados durante toda a vida escolar sejam modificados, às vezes subvertidos, em 120 dias, em pouco mais que 80 horas de aula. A melhor solução seria conjunta, direcionada a diversos âmbitos, sejam eles individuais ou institucionais, levando à diversificação das práticas educacionais, levando a uma melhor aprendizagem dos estudantes.

4.9.2. CATEGORIA II – ANDAMENTO DA DISCIPLINA

O monitor 3 apontou a dificuldade no **acompanhamento da disciplina** por alguns estudantes.

> *Uma desvantagem de ministrar a disciplina desta forma é que o andamento do curso não é igual para todos os alunos, **como eles são separados em grupos**, uns grupos realizam as tarefas mais rápido do que outros e isso é prejudicial, pois alguns alunos ficam defasados enquanto outros passam um bom tempo esperando que os demais o alcancem, fazendo que percam um pouco o interesse pelo curso* (3).

Essa questão é interessante, pois há duas possíveis soluções, de acordo com a maneira como os estudantes realizaram suas atividades.

Houve casos, no início da disciplina, em que os estudantes, conhecendo a metodologia (planejamento – manipulação – TDAR), "maquiavam" seus planejamentos para poder ir ao laboratório antecipadamente, e portanto, sair cedo. Como a metodologia das aulas era baseada na colaboração entre estudantes e orientadores, aqueles que quiseram burlar o esquema estabelecido puderam sair mais cedo, porém foram prejudicados nas aulas de laboratório e nas avaliações formais. Para esse tipo de problema o "tempo foi o melhor remédio", pois mostrou a alguns estudantes que a presença nas discussões não só era importante, mas necessária para um bom acompanhamento da disciplina.

Porém, para os casos em que alguns grupos terminavam suas discussões antes de outros, a solução era realmente permitir que estes fossem para o laboratório acompanhados de orientadores. O número de orientadores, apesar de satisfatório para a disciplina aplicada em 2003, não permitiu que se dispusesse de monitores ao mesmo tempo em dois locais. Esse problema seria facilmente sanado caso houvesse um número ainda maior de orientadores.

4.9.3. CATEGORIA III – MATURIDADE DISCENTE

Dois monitores comentaram sobre a **experiência discente**.

> ***Algumas vezes os alunos ficam desanimados porque seus experimentos não deram certo,*** *pois eles gostariam de respostas simples para os seus problemas.* ***Lidar com esse tipo de insatisfação é bastante complicado e difícil*** (5).

O excerto da resposta do estudante 5 revela uma atitude muito comum nos estudantes, provavelmente derivada de sua escolaridade prévia.

> ***Muitas vezes o projeto de trabalho não atinge os objetivos pretendidos, o que é muito frustrante.*** *Além disso, os alunos invariavelmente não possuem conhecimentos necessários para realizar o planejamento dos experimentos satisfatoriamente* (6).

Inicialmente houve alguma dificuldade em fazer com que estudantes inexperientes começassem a estabelecer hipóteses e relações, como num trabalho científico. As justificativas dadas pelos monitores, associadas à observação realizada durante a aplicação da disciplina, demonstraram o esforço de tentar fazer os estudantes trabalharem em condições desconhecidas.

4.9.4. CATEGORIA IV – TEMPO DE DEDICAÇÃO E NÚMERO DE PARTICIPANTES

Apesar das próximas respostas apresentarem diferentes críticas, pode-se compor um quadro relativo às características da metodologia aplicada, em que as necessidades apontadas – **tempo de dedicação** e **número de participantes** – podem ser vistas, numa interpretação superficial, como uma desvantagem, mas não o são necessariamente.

> *A necessidade de muitos monitores, que não vejo como uma desvantagem, mas que pode ser, dependendo do local onde for ministrada* (8).
>
> *São necessárias muitas horas de dedicação dos professores, monitores e principalmente uma boa carga horária na grade dos alunos. Em suma o tempo de dedicação é muito maior que de aulas "pré moldadas"* (9).

A discussão entre grupos deve ser assessorada por um participante mais experiente, que guie os estudantes durante o processo de aprendizagem. Em disciplinas construídas para haver discussão em grupos, a razão orientador/estudantes deve ser maior que em uma disciplina convencional. Este número maior não precisa obrigatoriamente ser composto por professores - pode ser satisfeito com a participação efetiva de monitores. Comparando-se as disciplinas do período diurno aplicadas em 2002 e 2003, o número de monitores no último ano foi maior, facilitando o trabalho de discussão. E como apontado, o número de monitores não é propriamente *uma desvantagem, mas que pode ser, dependendo do local onde for ministrada*.

Outro fator apontado é o tempo de dedicação dos participantes. A criação, elaboração e construção da disciplina foram realizadas pelo autor da presente dissertação, à época estudante de pós-graduação, auxiliado por quatro docentes e consumiu um tempo considerável. Durante a aplicação da disciplina, reuniões semanais extraclasse foram realizadas entre professores, monitores, colaboradores e técnicos, para discussão das aulas seguintes, a maioria tomando um período do dia, geralmente o vespertino. Além disso alguns estudantes também trabalharam em dias adicionais aos das aulas para repetir alguns experimentos, sempre auxiliados pelos orientadores.

PARTE III

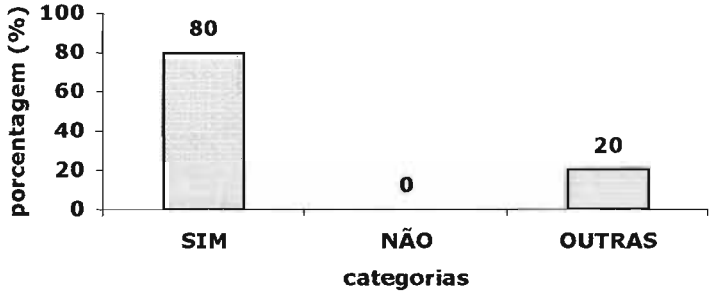
RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS DOS PROFESSORES SOBRE A SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

4.10. VOCÊ ACHA QUE ESTE TIPO DE DISCIPLINA LEVA A UM MELHOR APRENDIZADO?

(Questão 13 – Questionário 4)

Dos professores que preencheram o Questionário 4, quatro foram agrupados na Categoria I, pois responderam afirmativamente, enquanto um docente respondeu negativamente. Porém seu comentário fez com que sua resposta fosse alocada na Categoria III (Figura 15). Os docentes 1 e 5, ambos na Categoria I, não justificaram suas respostas ou fizeram quaisquer comentários.

Figura 15 – Distribuição das respostas da Questão 13 do Questionário 4 (5 professores)



A tarefa de organizar e categorizar as respostas dos cinco professores foi muito difícil, pois quase sempre cada resposta apresentou um conteúdo diferente de outro, dificultando o agrupamento em categorias comuns. Porém, quando possível, a categorização foi realizada.

4.10.1. CATEGORIA I – SIM

1. O professor 2 apresentou duas justificativas e um comentário sobre o **comprometimento dos estudantes** com a disciplina.

> *Acho que as condições de aprendizado que este tipo de disciplina propicia ao aluno são muito melhores para que ele tenha construa uma bagagem útil de conhecimentos, e para que ele exerça sua capacidade de crítica. Se o aluno concorda em participar do propósito do curso então ele sem dúvida tem um melhor aprendizado.*

Há preocupação tanto com o conteúdo (*construa uma bagagem útil de conhecimentos*) quanto com as habilidades (*exerça sua capacidade de crítica*).

Também estabelece uma relação entre o sucesso da disciplina e a concordância pelos estudantes *em participar do propósito do curso.*

2. O professor 3 acreditou que a disciplina levou a um melhor aprendizado mas estabeleceu uma **condição necessária para o seu sucesso**.

> *Sim, quando aplicada a seu público específico entendo que esta seja das melhores formas de ensino. Este curso de Bioquímica Experimental é perfeitamente adequado ao curso de Ciências Farmacêuticas mas possivelmente não tão interessante para outros curso de saúde. Como a motivação do aluno para o estudo individual e grupo é determinante para o sucesso do curso, o público alvo deve ser considerado. Exatamente por isto, entendo que devam haver alguns ajustes entre o curso do diurno e do noturno, pelas características específicas destas turmas.*

O docente descreveu os ajustes realizados durante o desenvolvimento da disciplina (seção 3.2, p. 31-2). O comentário indica que a disciplina obteve êxito em sua construção.

4.10.2. CATEGORIA III – OUTRAS CONSIDERAÇÕES

O docente 4 não concordou sobre a disciplina levar a um melhor aprendizado porém afirmou a possibilidade de **desenvolvimento de outras habilidades**.

> *Não. É possível que desenvolva diferentes habilidades, porém não é possível classificá-las como melhores ou piores.*

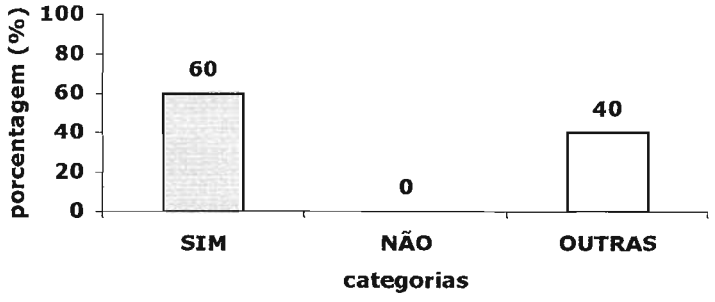
Infelizmente não se dispõe de informações que possam revelar quais são as habilidades citadas.

4.11. A FORMA DE CONDUZIR A DISCIPLINA (COMO SIMULAÇÃO DE UM PROJETO) PERMITE ENSINAR MELHOR OS ESTUDANTES DO QUE AS FORMAS CONVENCIONAIS?

(Questão 1 – Questionário 4)

Três docentes responderam afirmativamente (Categoria I). Duas respostas foram enquadradas na Categoria III (Figura 16), embora ressaltassem aspectos positivos. Todos justificaram suas respostas.

Figura 16 – Distribuição das respostas da Questão 1 do Questionário 4 (5 professores)



4.11.1. CATEGORIA I – SIM

1. O professor 1 foi contundente. Sua resposta apontou uma razão pela qual ele considerou que a simulação permite ensinar melhor. Fez também uma comparação com disciplinas tradicionais.

> *Sem dúvida, porque encontramos situações não previsíveis, mais próximas dos problemas que encontramos no dia a dia de um laboratório, nas quais o aprendizado é maior do que numa prática padronizada em que tudo dá certo e a flexibilidade experimental é pequena.*

2. O docente 3, em uma longa e elaborada resposta, citou duas razões pelas quais considera ser a simulação mais efetiva, além de também ter feito uma comparação entre as metodologias tradicional e colaborativa.

> *Sim, pelo menos de duas formas:*
>
> *- O encadeamento do conteúdo das aulas práticas faz com que a informação adquirida em uma oportunidade freqüentemente seja utilizada nas aulas seguintes, justificando prontamente a necessidade do conhecimento adquirido. Entendo que assim ocorre melhor fixação dos*

conceitos estudados pelos alunos quando comparado a uma condição onde o professor apenas informa que um conceito ou técnica em particular é importante, descrevendo situações hipotéticas onde poderia ser aplicada.

*- **Esta organização das aulas encadeadas** aproxima-se mais de possíveis situações reais que o aluno vai encontrar no exercício da sua profissão **(especialmente no caso de farmacêuticos) do que a aulas isoladas.***

A combinação destas características torna esta abordagem mais motivadora para muitos alunos.

3. Para o professor 5 uma disciplina simuladora pode trazer diversos resultados.

***Acho que sim. Este tipo de curso** induz mais intensamente o questionamento, **o** interesse pela busca de informações, **o** planejamento, organização do trabalho a ser realizado **e o** desenvolvimento de habilidades específicas.*

4.11.2. CATEGORIA III – OUTRAS CONSIDERAÇÕES

1. Apesar de não responder nem afirmativamente nem negativamente, o docente 2 apontou uma característica extremamente positiva:

***Na minha opinião esta forma de ensino adotada na QBQ216** motiva, ou deveria motivar mais os alunos, **o que** estimula o aprendizado.*

2. Apesar de apontar que

(...) não é possível afirmar que esta forma seja melhor, pois não disponho de dados para comparação (...),

o professor 4 também citou algumas características positivas, indo ao encontro da resposta do docente 3.

***A simulação de um projeto permite** uma continuidade entre os experimentos, desta forma os conceitos são constantemente reutilizados. **Esta "reutilização" provavelmente** facilita a memorização e o entendimento **(...)**.*

4.12. COMO VOCÊ PREFERE MINISTRAR UM CURSO EXPERIMENTAL?

I. SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

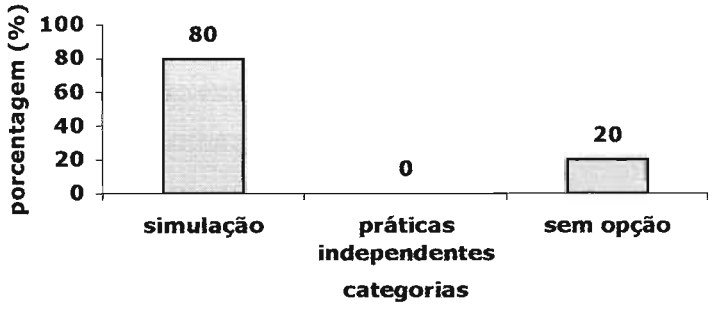
II. PRÁTICAS INDEPENDENTES UMAS DAS OUTRAS.

JUSTIFIQUE SUA ESCOLHA.

(Questão 10 – Questionário 4)

Nenhum docente optou por práticas independentes. Quatro optaram pela simulação (Categoria I). A resposta do professor 5 não permitiu classificá-la em nenhuma das duas alternativas dadas, sendo, portanto, alocada na Categoria III (figura 17).

Figura 17 – Distribuição das respostas da Questão 10 do Questionário 4 (5 professores)



4.12.1. CATEGORIA I – SIMULAÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA

1. O professor 1, além da justificativa sobre **aprendizagem**, apresentou um comentário sobre a **quantidade de trabalho** despendido pelos participantes.

> *O aprendizado é muito maior, apesar do trabalho do aluno e do professor também ser muito maior.*

2. Os docentes 2 e 3 relataram suas percepções sobre a **aprendizagem dos estudantes**, comparando, ao final, as duas metodologias.

> *Tendo sido um dos proponentes deste curso, seria estranho que eu não o preferisse. Mas ao longo da experiência acumulada nestes dois anos, este tipo de curso experimental dá ao professor uma sensação de que está ensinando algo significativo. Isto não acontece no modelo de práticas isoladas* (2).

Entendo que a simulação de projeto de pesquisa é uma abordagem mais efetiva de ensino que práticas isoladas, ***pelas razões discutidas anteriormente*** (3).

3. O professor 4 explicou que preferiu a simulação devido à

possibilidade de encadear vários experimentos em uma seqüência lógica.

4.12.2. CATEGORIA III – SEM OPÇÃO

1. O docente 5 não optou por nenhuma metodologia. Porém fez considerações pertinentes quanto à escolha do tipo de disciplina, pois apresentou diversas características, que são pontos de partida para permitir a desenvolvedores enquadrar uma disciplina em quaisquer dos seus modelos, como feito para essa disciplina.

A escolha depende da turma (curso, tamanho), da carga horária, do número de professores, do número de monitores e da infra-estrutura disponível no laboratório didático.

Para uma disciplina simuladora (conforme Métodos, seção 3.1, p. 30-1), há a necessidade de grande carga horária e um número razoável de orientadores, além de o laboratório conter os elementos básicos para uma boa aula prática.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

4.13. QUAIS AS PRINCIPAIS VANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA?

(Questão 6 – Questionário 4)

Todos os professores responderam a questão. Não foi possível sua categorização por similaridade pois as respostas apresentaram conteúdos diversos. Optou-se pela apresentação e discussão de cada resposta individualmente, mas, quando possível, comparou-se respostas.

1. O professor 4 apontou como vantagem a **divisão em grupos**. Implicitamente comparou **aulas expositivas clássicas**, em que prevalece o discurso para os estudantes, e **discussão em grupos**, mediada pelos orientadores.

> ***As aulas em pequenos grupos*** *parecem favorecer a concentração dos alunos. Penso que isto esteja relacionado com a conversa em pequenos grupos, pois nesta condição a discussão torna-se mais pessoal do que uma apresentação para a sala toda. (É mais fácil acompanhar uma conversa do que um discurso).* ***Logo, a simples divisão da sala em pequenos grupos é vantajosa.***

2. O docente 5 demonstrou indecisão em relatar as vantagens. Justificou para isso sua falta de experiência. Mesmo assim apontou algumas, no seu ponto de vista, inegáveis.

> ***Como foi a minha primeira experiência neste tipo de disciplina, confesso que ainda não estou totalmente confortável na minha avaliação.*** *Os pontos citados na resposta da questão 1* [seção 4.11.1, item 3, p. 97], *entretanto, constituem uma vantagem inegável desta forma de ensinar.*

3. O professor 1 apontou aspectos relacionados à **aprendizagem e vida acadêmica**.

> *Rendimento dos alunos em termos de aprendizado é muito maior que em aulas convencionais e dá a idéia do que ocorre em laboratórios de "verdade".*

4. A resposta do docente 2 abordou um **aspecto de natureza interpessoal** entre estudante e orientadores, mostrando a importância do compromisso, responsabilidade e cumplicidade entre os participantes nesse tipo de trabalho, como em laboratórios reais.

O engajamento do binômio professor-alunos (entendendo-se como professor o conjunto professor + monitores) no curso e o fato de que os alunos neste curso são tratados como pessoas adultas, responsáveis e inteligentes.

5. O professor 3 apresentou alguns aspectos muito elucidativos. Sua preocupação com o **processo ensino-aprendizagem** para desenvolver nos estudantes as habilidades necessárias foi ressaltada.

O encadeamento lógico de conceitos facilita o trabalho do professor. As técnicas aprendidas, que poderiam ser encaradas pelos alunos como ferramentas de uso em um futuro não determinado, eram empregadas com um propósito, dentro de um contexto do projeto. ***Para isto ser efetivo o objetivo principal do curso/projeto tem que estar completamente claro ao aluno.*** *Além disto, o aluno aprende a diferenciar a utilidade de cada técnica. Um curso prático convencional pode incluir uma aula de espectrofotometria e uma de cromatografia, mas neste formato de simulação de projeto adicionalmente é possível evidenciar a importância da espectrofotometria para acompanhamento do rendimento do processo e da qualidade da preparação obtida (como foi executado em diversas aulas) em comparação à cromatografia, que é utilizada com mais freqüência como uma etapa integrante do processo.*

As duas primeiras frases revelam extrema preocupação com a qualidade do ensino ministrado. O professor estabelece diferenças entre o emprego das práticas nos dois modelos. O docente explicou de maneira pormenorizada como uma disciplina simuladora pode beneficiar tanto o conteúdo quanto a forma. Isso foi entendido pela capacidade da simulação de mostrar a aplicabilidade de cada prática. Em práticas isoladas isso não seria possível, pois não há contextualização.

4.14. QUAIS AS PRINCIPAIS DESVANTAGENS DESSA FORMA DE MINISTRAR A DISCIPLINA?

(Questão 7 – Questionário 4)

Todos os professores responderam a questão. Cabe ressaltar que há inserida na maioria das respostas uma enorme preocupação na qualidade do ensino ministrado.

1. A **inexperiência e o despreparo discente** foram apontados por 60% dos docentes como uma desvantagem na disciplina.

> *Os alunos que não acompanharam adequadamente o curso desde seu início tiveram muita dificuldade em se recuperar durante o decorrer das aulas,* ***pois as informações eram cumulativas*** *(...)* (3).
>
> ***Quase sempre aparecem problemas e, se o professor não for rápido e tiver bom treino,*** *ele não consegue resolver os problemas e os alunos ficam frustados. Eles estão acostumados a que tudo dê certo e se sentem incompetentes quando algo dá errado. Eles tem uma auto estima muito grande quanto a sua capacidade técnica e quando as coisas dão errado eles entram em desespero porque atribuem os problemas que aparecem a sua "incompetência", o que nem sempre é o caso* (1).
>
> ***- Lidar com o despreparo dos estudantes frente a: 1) experimentos mal sucedidos e dados negativos, 2) necessidade de adequação e repetição de experimentos diante de resultados negativos.*** *Não é sempre fácil fazê-los entender que o sucesso ou insucesso dos experimentos realizados depende das suas naturezas e complexidades, bem como da inexperiência, falta de determinadas habilidades, falta de atenção durante a leitura dos protocolos e/ou aulas de discussão e certo comodismo frente à busca de conhecimento por parte dos experimentadores (5).*

2. Dois docentes fizeram críticas a respeito da **necessidade de trabalho adicional**, um fato já apontado pelos monitores (seção 4.9.4, p. 92).

> *A quantidade adicional de trabalho docente na montagem e acompanhamento do curso. Para a grande maioria de docentes do Depto. de Bioquímica do IQUSP este é um pecado mortal neste tipo de disciplina* (2).
>
> *(...) A execução do curso é mais complexa e requer um nível de dedicação mais elevado de monitores e professores em relação a cursos estruturados de outra maneira(...)* (3).

3. O professor 4, da mesma forma que apontou como uma vantagem (seção 4.13, item 1, p. 100), apontou a **discussão em grupos** como uma desvantagem.

Necessidade de repetição da mesma discussão em diversos grupos.

5. O docente 5 também apontou a **falta de infra-estrutura do laboratório didático**.

(...) contornar os problemas de infra-estrutura do laboratório didático onde o projeto se desenvolverá experimentalmente ***(na disciplina ministrada em 2003 muitos experimentos só foram possíveis graças ao empenho dos professores e monitores e a doações de reagentes e empréstimos de equipamentos feitos por nós professores).***

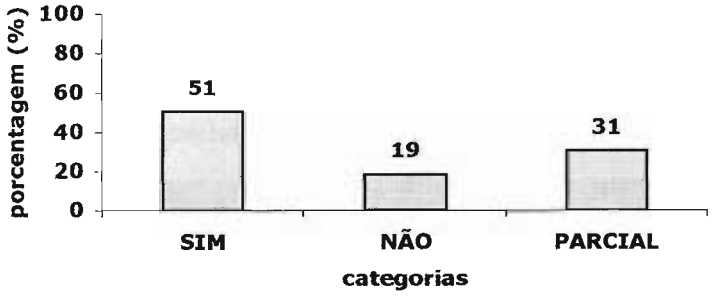
PARTE IV

RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS DOS ESTUDANTES SOBRE AS AULAS DE PLANEJAMENTO, TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.15. AS AULAS DE PLANEJAMENTO ATINGIRAM SEUS OBJETIVOS? (Questão 5B – Questionário 2)

Todos os estudantes responderam a questão. Mais da metade respondeu afirmativamente (Categoria I). Apenas um quinto respondeu negativamente (Categoria II). As outras respostas correspondem à terceira categoria, que englobou respostas parciais (Figura 18).

Figura 18 – Distribuição das respostas da Questão 5B do Questionário 2 (75 estudantes)



4.15.1. CATEGORIA I – SIM

Dos 38 estudantes que afirmaram terem as aulas de Planejamento atingido seus objetivos, seis fizeram comentários, todos pertinentes. Eles abordaram temas tais como tempo e importância das aulas e grupos de discussão.

Apesar da aparência de críticas de algumas respostas, estas foram entendidas como sugestões de possíveis melhorias, já que foram categóricas em afirmar que as aulas de Planejamento atingiram seus objetivos.

Alguns comentários relatados não foram diretamente ligados a um assunto comum

(...) ***para mim*** *eram muito importantes e atingiam o objetivo* (52).

1. Dois estudantes relataram problemas relativos ao **tempo** das aulas de Planejamento.

Atingiram, porém houve aulas de planejamento *muito longas (principalmente as primeiras) que ficaram cansativas* (10).

Sim, na maioria. Algumas aulas de planejamento foram cortadas devido à falta de tempo, mas elas eram extremamente importantes (49).

O primeiro estudante destacou que havia muito tempo para as aulas. Paradoxalmente o segundo declarou o contrário. Isso pode ser devido a alguns fatores, incluindo o preparo inicial dos estudantes. Decorrente desse fato, pode ter havido discrepâncias no acompanhamento dos estudantes, o que seria natural, já que cada um vinha com sua própria bagagem de conhecimentos e experiências.

Também houve o fato de, apesar de a disciplina ter sido exaustivamente planejada, modificações em seu cronograma tiveram que ser realizadas devido à própria natureza do projeto. Algumas aulas tiveram que ser encurtadas, outras prolongadas, em decorrência do andamento real da disciplina.

2. Duas respostas são significativas por comentar a **experiência discente**, aspecto já ressaltado anteriormente por professores e monitores (seção 4.9.3, p. 91). Uma disciplina simuladora necessita do entendimento, cumplicidade e cooperação dos estudantes. Quando um estudante não participa da construção desse processo efetivamente, pode prejudicar os demais membros de sua equipe, pois estará interferindo na aprendizagem de seus pares.

Quando discutido detalhadamente com o grupo sim, *porém nem sempre seu grupo está disposto a responder concisamente* (23).

Em relação à idéia sim, mas eu acho *que uma aula expositiva sobre o que faríamos seria melhor do que responder diversas perguntas diretamente* (37).

Tentou-se minimizar esse fator complicador de diversas maneiras, tais como um acompanhamento mais personalizado e conversas pessoais com os estudantes para descobrir e entender os motivos do desinteresse. Alguns estudantes simplesmente não tiveram interesse em acompanhar a disciplina da maneira sugerida. A ação dos grupos e subgrupos no desenvolvimento das aulas, nesse caso, foi de extrema importância. Alguns estudantes menos interessados foram paulatinamente "contaminados" pelo interesse e empenho dos colegas mais aplicados.

Portanto, apesar das diversas queixas sobre o fato dos grupos e subgrupos terem sido compostos de maneira arbitrária pelos docentes, houve um aspecto não ressaltado pelas avaliações, de extrema importância. Os estudantes tiveram que lidar com o estranho, trabalhando com e adaptando-se a outros estudantes que não

faziam parte de seus círculos de amizade. Ainda que não fosse o objetivo principal da disciplina a maioria dos estudantes lidaram com essa situação que, certamente, repetir-se-á em suas carreiras profissionais.

Quanto à resposta do estudante 37, nota-se a inexperiência discente sobre a metodologia de trabalho, aliado ao fato da falta de costume em trabalhar colaborativamente.

4.15.2. CATEGORIA II – NÃO

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Menos de 20% dos estudantes responderam negativamente à questão. Dos 14, seis fizeram comentários enfocados no tempo das aulas, na atuação dos grupos e comentários sobre os orientadores.

1. Dois estudantes apontaram a **falta de tempo disponível** para realizar as aulas.

   Não, porque tínhamos tempo para terminar e fazíamos tudo correndo (1).

   Não. Era muita corrido e professor/monitores partiam do princípio que já sabíamos tudo da matéria teórica, o que não era verdade (74).

Conforme apontado anteriormente (seção 3.3.3.1, p. 36-7), tentou-se equilibrar as aulas práticas com os períodos de discussão de maneira a não sobrecarregar nem um nem outro. Porém infelizmente para alguns estudantes o problema da falta de tempo foi um fato. No início da disciplina muitos estudantes queixavam-se da falta de tempo, mas com a experiência adquirida a maioria deles obteve êxito em conseguir terminar seus experimentos dentro do horário estipulado.

2. Outros dois estudantes citaram o **grupo** como um fator para o insucesso das aulas.

   Não, mas foi por causa do grupo (36).

   Atingiriam se o grupo fosse unido ou pelo menos empenhado (60).

Infelizmente, como em qualquer disciplina obrigatória, houve que se lidar com estudantes que não estavam interessados na disciplina. Não se cogitou empregar um método coercivo para obrigar tais estudantes a participar das aulas, pois ele ia de encontro com os preceitos dos desenvolvedores sobre como se portar em tais situações. Esses estudantes geravam momentos de tensão, na medida em que não

cooperaram com seus grupos e subgrupos. De diversas maneiras tentou-se minimizar a ação entrópica, através de conversas pessoais. Na maioria das vezes os resultados eram satisfatórios.

Porém, a aprendizagem de trabalhar com pessoas estranhas, adaptando-se aos seus estilos de trabalho para o sucesso de uma empreitada, supera o problema inicial das pessoas, além de torná-las profissionalmente mais maduras.

3. Alguns estudantes mencionaram a participação dos orientadores.

> ***Não, deveríamos ter mais aulas de planejamento*** *com professor disposto a ensinar* (63).
>
> ***Não. Era muita corrido e*** *professor/monitores partiam do princípio que já sabíamos tudo da matéria teórica, o que não era verdade* (74).

De acordo com as observações em sala, todos os orientadores estavam *dispostos a ensinar*. Porém as atitudes perante os estudantes foram outras. A falta de hábito dos estudantes de serem questionados sobre a validade de seus argumentos durante as discussões, em vez de simplesmente obter respostas prontas, pode ser considerada uma explicação plausível para as respostas apresentadas.

Outra possibilidade para tais afirmações é a insegurança de alguns professores e monitores frente a um modelo aplicado pela primeira vez.

4. Numa outra resposta, o estudante 67 comentou sobre como as aulas foram discutidas.

> *Não, poucos métodos* ***(talvez só os dos softwares)*** *foram discutidos mais a fundo.*

4.15.3. CATEGORIA III - PARCIALMENTE

Foram 23 as respostas alocadas nessa categoria. Fez-se uma subcategorização, pelo fato de apresentarem matizes. 13 respostas apresentaram um matiz claramente afirmativo, enquanto sete apresentaram um matiz negativo. Somente uma resposta foi considerada neutra.

1. Respostas afirmativas.

> *Na maioria das vezes sim* (16).
>
> *Nem sempre* (21) (24).

Um pouco. Pela nota acho que não (41).

No começo e no fim do curso. No meio do curso elas ficaram um pouco defasadas (42).

Apenas nas primeiras aulas (56).

Na maioria das vezes (58).

Algumas vezes. Outras ainda ficaram no ar (66).

Em geral sim, mas sem aprofundamento (73).

2. Resposta neutra.

Relativamente, ficando a desejar nos aspecto "macetes" (75).

3. Respostas negativas.

Pouco (17) (47).

Porém, mais importante que a classificação por matizes, algumas respostas puderam ser classificadas pelos comentários e/ou justificativas apresentadas.

4. Da mesma forma que em categorias anteriores, as respostas alocadas nesta também ressaltaram a questão do **tempo**.

Algumas vezes não, *porque não sobrava tempo para discutir o que havíamos feito* ***e*** *ter uma explicação rápida sobre tudo,* ***mas na maioria das vezes sim*** (3) (afirmativa).

Algumas não, *pois o tempo disponível era pouco,* ***de tal maneira que chegamos a ir para o laboratório sem terminar o planejamento, o que prejudicou em partes a experiência (demoramos mais e fizemos errado...)*** (9) (afirmativa).

Poucas vezes, *na maioria das vezes não havia tempo suficiente para discussão adequada* (22) (negativa).

Muitas vezes não tínhamos tempo para discutir os planejamentos, ***nem discutir os tópicos principais*** (40) (negativa).

5. O **grupo** é novamente apontado como um forte fator para a participação adequada dos estudantes.

Muito pouco. Só aprendi quando eu procurava a professora e as monitoras, *porque meu grupo não se entrosou e, por causa disso, não havia discussão* (64) (negativa).

6. Alguns estudantes discorreram sobre a **forma** como as aulas foram ministradas.

Parcialmente, muitas vezes. *Como não tínhamos aula com teoria, podíamos discutir o assunto erroneamente* (34) (afirmativa).

Quando discutido, sim (50) (afirmativa).

Algumas não, porque *algumas dúvidas não ficavam muito bem esclarecidas* (53) (afirmativa).

Não muito. Algumas sim mas outras (a maioria, não). *As perguntas eram muito repetitivas* (14) (negativa).

7. Algumas respostas apontaram para a participação dos orientadores.

Poderia ser mais dinâmico, com um auxílio maior dos professores e monitores, para não ser perdido tempo (29) (afirmativa).

Somente aquelas que tiveram as questões discutidas pelos professores ***(muitas delas não foram)*** (70) (negativa).

4.15.4. OBSERVAÇÕES FINAIS

Reagrupou-se as respostas dos estudantes simplesmente em respostas afirmativas e negativas. O grupo de respostas afirmativas englobou as 38 respostas da Categoria I e as 14 respostas afirmativas da Categoria III. O grupo das respostas negativas englobou um total de 21 respostas, 14 da Categoria II e 7 respostas negativas da Categoria III.

Assim, cerca de 70% dos estudantes concordaram total ou parcialmente que as aulas de Planejamento atingiram seus objetivos (parcialmente aqui é utilizado no sentido que somente algumas aulas, do seu total, não cumpriram satisfatoriamente seus objetivos).

Já os outros 30% afirmaram que as aulas não cumpriram seu papel total ou parcialmente.

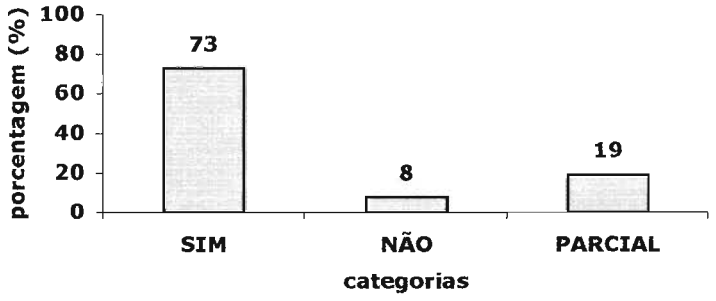
Não há mudanças significativas na distribuição das respostas quando se inclui nessa classificação as respostas neutras da Categoria III (uma única resposta).

4.15.5. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS

A distribuição das respostas dos estudantes consideradas multicategóricas (seção 4.2.6, p. 63-4) revelou um aumento de em torno de 20% das respostas da Categoria I em relação ao total de estudantes, enquanto há uma diminuição significativa das Categorias II e III. Ela reforça as respostas dadas pelo conjunto de

estudantes de que as aulas de Planejamento atingiram seus objetivos, apesar das diversas considerações e sugestões dadas (Figura 19).

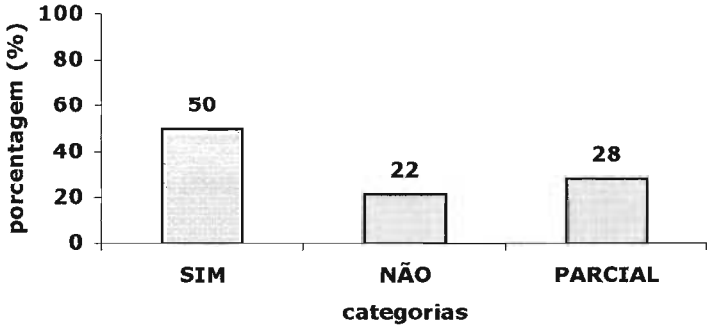
Figura 19 – Distribuição das respostas da Questão 5B do Questionário 2 (26 estudantes)



4.16. AS AULAS DE TD+AR ATINGIRAM SEUS OBJETIVOS? (Questão 6C – Questionário 2)

Todos os estudantes responderam a esta questão, porém a resposta do estudante 43 (*não sei*) não foi considerada pertinente. Dos 74 estudantes, metade respondeu Sim (Categoria I) e cerca de um quinto respondeu Não (Categoria II). Foram agrupadas na Categoria III as respostas parciais (Tabela 20).

Figura 20 – Distribuição das respostas da Questão 6C do Questionário 2 (74 estudantes)



4.16.1. CATEGORIA I – SIM

Dos 37 estudantes que concordaram que as aulas de TD+AR atingiram seus objetivos, seis fizeram comentários.

1. Dois estudantes fizeram **elogios às aulas**. A resposta do estudante 3 é significativa pois relata o procedimento mais utilizado em aula.

   Sim, porque discutíamos os resultados entre nós e depois com os monitores (3).

   Sim, contribuindo para maior aprendizado (29).

2. Outros estudantes fizeram **comentários e sugestões diversos**.

   Sim, mas nem sempre era possível concluir o que deu errado (7).

   Sim, apesar de que as conclusões finais não foram feitas em classe (30).

3. A **questão do tempo** foi apontada por um estudante, que também sugeriu uma modificação na aula.

Sim. Mas faltou tempo. Sugiro que diminua o número de práticas para ter mais tempo suficiente para entendermos melhor cada uma delas (74).

A sugestão é aceitável e pertinente mas, como foi esclarecido em Métodos (seção 3.3.3.1, p. 36-7), tentou-se conciliar, na medida do possível, os conteúdos com as formas.

O estudante 49 apontou, além da questão do tempo, a **falta de instrução aos estudantes** nas aulas.

Sim, quando o tempo era suficiente. ***Às vezes não se tinha discussão suficiente pela falta de tempo ou*** *pela falta de instrução dos alunos na realização do tratamento* (49).

4.16.2. CATEGORIA II - NÃO

Pouco mais de um quinto dos estudantes (16) discordou da questão. Seis estudantes comentaram suas respostas.

1. Três comentários citaram os **grupos** como razão do insucesso das aulas.

Não. *Uma pessoa já chegava com tudo pronto* (4).

Não, *por causa do grupo* (36).

Não, *como os grupos não tinham afinidade, não se discutia nada* (57).

2. Outras respostas estavam relacionadas à **forma como os estudantes trataram e analisaram** a grande quantidade de dados obtidos.

Não! *Para mim o TD e AR era ir para a sala pró-aluno fazer gráficos. Além de fazer vários cálculos para inventar dados* (14).

Não. *Era sempre confuso aquele monte de dados que não sabíamos onde usar* (69).

Não. *Não sabíamos o que estávamos procurando* (28).

A interconexão das respostas é clara. A falta de familiaridade com os cálculos para o tratamento de dados fez com que uma grande parte do tempo das aulas fosse utilizado para esse fim, no início da disciplina. Conforme esperado, houve uma sensível melhora.

Após inúmeras solicitações, foi acertado entre os participantes que os cálculos e gráficos poderiam ser realizados na sala de informática (comumente conhecida como *Sala Pró-Aluno*). Porém foi verificado que nem todos os estudantes tiveram

uma noção clara do tempo que deveriam utilizar para fazer tais cálculos. Muitos somente voltavam ao laboratório quando a aula estava terminando.

Para solucionar esse problema, alguns grupos começaram a trazer seus cálculos prontos. Esta solução tomada pelos estudantes não foi questionada pelos orientadores, por ser constatado que não traria prejuízo. Em caso de dúvidas, estas seriam discutidas em aula.

A resposta 14, mais contudente, revelou como a inexperiência aliada ao despreparo discente podem distorcer uma nova abordagem curricular. O estudante não entendeu que analisar os dados era verificar suas pertinências em relação à situação explorada na prática, e que analisar os resultados não foi *inventar dados*, mas simplesmente analisar sua validade, veracidade e confiabilidade.

4.16.3. CATEGORIA III – PARCIALMENTE

Por ser uma categoria com respostas parciais, boa parte das 21 frases apresentaram comentários pertinentes. Como anteriormente (seção 4.15.3, p. 108-10), as respostas foram classificadas em afirmativas, negativas e neutras, esta última quando não se distinguia nenhum matiz. Para aquelas cujos comentários e justificativas revelaram-se relevantes, foi feita uma segunda classificação. Houve seis respostas afirmativas, seis negativas e nove neutras.

1. Respostas afirmativas.

   Nem sempre (21).

   Na medida do possível (46).

   Na maioria das vezes (58) (71).

   Nem sempre (59).

2. Respostas neutras.

   Não houve uma grande participação (1).

   Mais ou menos (41) (63).

3. Respostas negativas.

   No começo do curso foi melhor. No meio e no final do curso piorou, com algumas exceções (42).

Pouco (47).

4. Comentários sobre os **grupos** foram ressaltados pelos estudantes.

Os grupos não costumavam vir com os dados tratados ***e isso prejudicava e atrasava o TDAR*** (27) (neutra).

Mais ou menos, pois eram muito longas *e como cada grupo fazia individualmente, no final da aula havia grupos que não tinham acabado o TD,* ***logo não havia AR*** (51) (neutra).

Só quando a professora explicava para a sala. *Meu grupo não discutia, cada um fazia suas anotações e no máximo falava com quem estava do lado.* ***Essas aulas acabaram se tornando chatas e aborrecidas*** (64) (neutra).

Quando o grupo não queria acabar tudo muito rápido ***a aula atingia o objetivo*** (72) (neutra).

Raramente, pois *alguns grupos não faziam o TD* (24) (negativa).

Bom, *quando o meu grupo acorda animado, em 10% das vezes dá certo, mas a maioria não apresenta os dados e não colabora em nada* (60) (negativa).

5. Outros comentários ressaltados foram relativos ao **tempo das aulas**.

Havia pouquíssimo tempo para TD+AR ***e freqüentemente restavam dúvidas*** (25) (neutra).

Mais ou menos, *pois eram muito longas* ***e como cada grupo fazia individualmente, no final da aula havia grupos que não tinham acabado o TD, logo não havia AR*** (51) (neutra).

Muitas vezes não. *Não se teve tempo para discussão dos dados* ***e não se teve orientação para construção de gráficos nem para utilização dos cálculos.*** *Isso significou perda de tempo* (40) (negativa).

6. O **papel dos orientadores** também foi comentado.

No início não, porque quase não havia auxílio. Porém no fim do curso (do meio para o fim) os resultados foram bem discutidos (22) (afirmativa).

Mais ou menos, *algumas informações faltavam às vezes* (45) (neutra).

Só quando a professora explicava para a sala. ***Meu grupo não discutia, cada um fazia suas anotações e no máximo falava com quem estava do lado. Essas aulas acabaram se tornando chatas e aborrecidas*** (64) (neutra).

Muitas vezes não. Não se teve tempo para discussão dos dados e *não se teve orientação para construção de gráficos nem para utilização dos cálculos.* ***Isso significou perda de tempo*** (40) (negativa).

Às vezes, pois *só funcionava quando os alunos chegavam a uma conclusão sozinhos* (67) (negativa).

4.16.4. OBSERVAÇÕES FINAIS

De maneira semelhante à seção 4.15.4 (p. 110), pôde-se considerar que houve 43 respostas efetivamente afirmativas (37 da Categoria I + 6 da Categoria III) e 22 respostas claramente negativas (16 da Categoria II + 6 da Categoria III). Nove respostas da Categoria III não foram classificadas por não haver distinção de matizes. O que se pode observar é uma tendência de considerar que as aulas de TDAR atingiram, pelo menos parcialmente, seus objetivos (Tabela 14).

Tabela 14 – Distribuição de respostas afirmativas e negativas

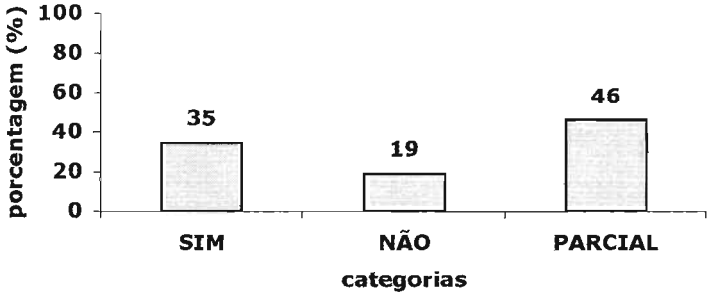
	distribuição excluindo respostas sem matizes (%)	distribuição incluindo respostas sem matizes (%)
Respostas afirmativas	66	58
Respostas negativas	34	30
Respostas sem matizes	-	12

4.16.5. RESPOSTAS MULTICATEGÓRICAS

Realizada a distribuição das respostas multicategóricas em relação à distribuição total de estudantes, a Categoria I caiu cerca de 15%, a Categoria II teve um ligeiro recuo, de 22% para 19%, enquanto a Categoria III cresceu 18%. Isso demonstrou haver uma insatisfação pelas aulas de TDAR, apesar de cerca de 80% (Categoria I + Categoria III) considerar as aulas satisfatórias (Figura 21).

Os comentários discentes apontaram imperfeições no cronograma adotado, que impõe constrições próprias de uma disciplina, diferindo assim de um projeto de pesquisa. Os comentários autorizam a conclusão que os estudantes não consideraram as aulas e, portanto, o método, intrinsecamente ruim.

Figura 21 – Distribuição das respostas da Questão 6C do Questionário 2 (26 estudantes)



PARTE V

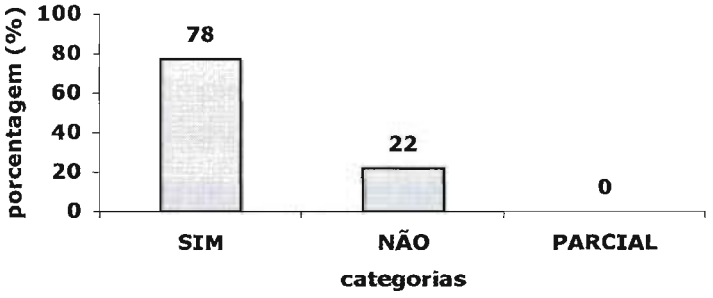
RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS DOS MONITORES SOBRE AS AULAS DE PLANEJAMENTO, TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.17. AS AULAS DE PLANEJAMENTO ATINGIRAM OS OBJETIVOS PROPOSTOS?

(Questão 8 – Questionário 3)

Sete monitores - cerca de 80% - responderam Sim (Categoria I). Dois responderam Não (Categoria II). Não houve nenhuma resposta ambígua, dual ou parcial (Figura 22).

Figura 22 – Distribuição das respostas da Questão 8 do Questionário 3 (9 monitores)



4.17.1. CATEGORIA I – SIM

Somente o monitor 2 comentou sua resposta; os demais limitaram-se a responder a questão:

Acredito que sim (1).

Sim, de modo geral (4).

As aulas de planejamento atingiram os objetivos propostos na maioria das vezes (5).

Sim (7)

Acredito que sim (8).

Creio que sim (9).

A resposta comenta um **comportamento discente**.

Sim, porém, creio que elas poderiam ter sido melhores caso os alunos tivessem lido de antemão os planejamentos (2).

Alguns problemas decorrentes da falta de leitura foram observados. Esse erro pôde ser sanado através da observação dos orientadores e discussão entre estes e os estudantes sobre tais comportamentos. Porém, de alguns estudantes – aqueles

pouco interessados na disciplina – não foi possível obter uma cooperação satisfatória.

Naturalmente, esta estratégia, como todas as outras, não pode ser vista como uma panacéia. Há pontos positivos e negativos que devem ser avaliados, e, ao final, sua adequação e efeitos devem ser medidos pelo porcentual dos participantes que se revelaram satisfeitos com sua adoção.

4.17.2. CATEGORIA II – NÃO

Somente dois monitores responderam negativamente a questão. O monitor 6 absteve-se de comentários, respondeu somente *não*. Porém o comentário do monitor 3, de grande valia, complementou a idéia exposta na Categoria I.

> *Não. Apenas para alguns alunos foram atingidos os objetivos, porque nem todos terminavam o planejamento por inteiro antes da realização da aula prática, e durante o laboratório muitos não sabiam o que estavam fazendo ou o que era para ser feito* (3).

Nota-se que esta resposta evidencia prováveis conseqüências das ações expressas na Categoria II.

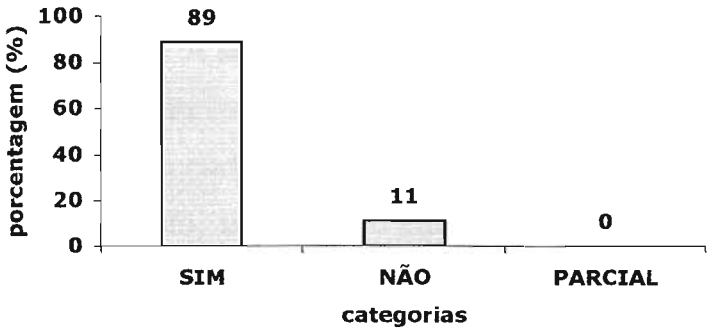
4.17.3. OBSERVAÇÕES FINAIS

De acordo com as observações feitas em aulas, é certo afirmar que muitos estudantes *não sabiam o que estavam fazendo ou o que era para ser feito* pois não se prepararam nas aulas de Planejamento. A leitura, apontada pelo monitor 2, e as discussões posteriores, fariam com que os estudantes se preparassem adequadamente para as aulas de manipulação, o que nem sempre foi o caso de todos.

4.18. AS AULAS DE TD+AR (TRATAMENTO DE DADOS + ANÁLISE DOS RESULTADOS) ATINGIRAM OS OBJETIVOS PROPOSTOS? (Questão 9 – Questionário 3)

Todos responderam a questão. Oito monitores responderam afirmativamente (Categoria I). Somente um monitor respondeu negativamente (Categoria II). Não houve respostas ambíguas (Figura 23).

Figura 23 – Distribuição das respostas da Questão 9 do Questionário 3 (9 monitores)



4.18.1. CATEGORIA I - SIM

1. Somente um monitor comentou sua resposta. Apontou a consecução de um dos **principais objetivos** das aulas de TDAR.

Sim e acredito ainda que essas aulas serviram ainda para sanar algumas dúvidas que acabam aparecendo no decorrer das práticas (2).

Dúvidas remanescentes após as aulas de Planejamento e Manipulação eram tratadas e resolvidas no TDAR. Esta aula constituía o fechamento de cada núcleo básico da simulação.

2. Demais respostas:

Sim (6) (7) (9).

Sim, de modo geral (4).

Acredito que sim (1) (8).

Acho que atingiram também os objetivos propostos (5).

4.18.2. CATEGORIA II – NÃO

Somente um monitor respondeu negativamente A questão. Seu comentário também é pertinente e interessante.

> *(...) não atingiram, porque somente em poucas aulas de TD+AR foram discutidos os assuntos referentes às aulas anteriores. Na maioria dessas aulas os alunos apenas trataram os dados, mas não fizeram uma análise dos resultados, eles ficavam esperando com que o professor fizesse a análise, foram poucas as vezes que realmente surgiu uma discussão dos resultados em sala de aula com grande participação dos alunos* (3).

Nota-se novamente uma característica clássica discente, indicativa do tipo de escolaridade recebida. Foi apontado que os estudantes *ficavam esperando com que o professor fizesse a análise*. A simulação do projeto não previa que isto ocorresse. O interesse era que os estudantes iniciassem um processo de discussão, o que no início da disciplina foi alcançado com êxito muito aquém do desejado. Com a continuidade do procedimento, um número cada vez maior de estudantes adotou uma participação ativa.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

PARTE VI

RESPOSTAS DOS QUESTIONÁRIOS DOS PROFESSORES SOBRE AS AULAS DE PLANEJAMENTO, TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.19. AS AULAS DE PLANEJAMENTO ATINGIRAM OS OBJETIVOS PROPOSTOS?

(Questão 8 – Questionário 4)

As respostas dos docentes não seguiram um padrão que permitisse a classificação em categorias comprobatórias ou reprobatórias. Tiveram um nível de elaboração e abrangência maior que as respostas de estudantes e monitores. Estas respostas merecem ser comentadas pormenorizadamente, e, quando possível, agrupadas.

Basicamente os docentes reconheceram virtudes e falhas na estrutura das aulas de Planejamento e assinalaram algumas de suas características. Para as falhas apontaram possíveis sugestões.

1. As aulas de Planejamento tiveram, em sua primeira aplicação, em 2002, um caráter de discussão totalmente guiada pelos orientadores, porém receberam muitas críticas dos estudantes. Eles consideraram-nas pouco claras, não havia nenhuma base ou texto orientador para direcionar as discussões entre estudantes, somente perguntas lançadas pelos orientadores. Na opinião dos estudantes, esse modelo fez deles "reféns" dos orientadores, pois não havia número suficiente destes para permitir discussões mais rápidas e qualitativamente mais elaboradas.

As aulas, portanto, não ganharam ritmo e qualidade. O tempo entre as "visitas" aos grupos de estudantes era muito longo e proporcionou aos estudantes muitos momentos de ócio. Na visão de todos os participantes, isso claramente dificultou o andamento das aulas.

Essas dificuldades foram o ponto de partida para as maiores mudanças na metodologia da disciplina de 2002 para 2003. Foi construído um novo modelo de aulas de Planejamento e TDAR (seções 3.3.3.1 e 3.3.3.3, p. 36-9 e 41-3).

As questões diretivas foram parte integrante da apostila da disciplina. Elas viriam imediatamente antes de cada prática (ou de um conjunto relacionado delas), perfazendo a seqüência da disciplina e, portanto, da simulação.

Portanto, nada mais justo que a preocupação dos docentes quanto à apostila, o esqueleto de toda a estrutura da disciplina. Os docentes fizeram comentários a respeito da **apostila**, e conseqüentemente, das aulas de Planejamento.

(...) ***Foi difícil motivar os alunos nestas atividades, pois a leitura prévia com atenção de longos procedimentos práticos pode ser bastante maçante (...)*** *Entendo que a apostila ainda requer aprimoramento como instrumento para direcionar esta atividade. Em termos gerais, a apostila é satisfatória na maioria das situações de aula, o que é louvável devido ao grande número de atividades realizadas durante o curso. No entanto, sugiro que a apostila traga mais informações complementares para o planejamento. Em muitas aulas, as informações requeridas não estavam disponíveis nos livros-texto mais comuns de Bioquímica, sendo encontradas apenas em livros mais específicos de Bioquímica Experimental ou até mesmo de Microbiologia, que usualmente não estavam disponíveis (...)* (3).

(...) ***Neste ano houve um problema na correção da prova porque as diferentes turmas tiveram informações confusas na preparação teórica da aula eletroforese, na bioquímica teórica e na bioquímica prática.*** *Temos que ter mais cuidado na preparação teórica dos experimentos* [da apostila] *e checar todas as respostas dos exercícios* [da apostila] *antes de ir para a aula prática, o que não foi feito em todos os experimentos (...)* (1).

(...) A apostila apresenta questões que facilitam o entendimento de cada "componente" (material, procedimento, etc...) do experimento, entretanto faltam questões que levem o aluno a de fato utilizar dados obtidos em experimentos anteriores para planejar o experimento seguinte, o que realmente caracterizaria a simulação de um projeto (4).

Nota-se a preocupação docente quanto à qualidade da apostila, sempre sugerindo prováveis ajustes.

Um resumo das qualidades e defeitos da apostila pode ser obtido por excertos das declarações docentes:

(...) em termos gerais, a apostila é satisfatória na maioria das situações de aula, o que é louvável devido ao grande número de atividades realizadas durante o curso (3).[Ela] *apresenta questões que facilitam o entendimento de cada "componente" (material, procedimento, etc...) do experimento* (4), [porém houve algumas falhas como, por exemplo, a] *(...) correção da prova porque as diferentes turmas tiveram informações confusas na preparação teórica da aula eletroforese, na bioquímica teórica e na bioquímica prática* (1). [Como possíveis sugestões]*(...) temos que ter mais cuidado na preparação teórica dos experimentos e checar todas as respostas dos exercícios antes de ir para a aula prática* (1). [Outra sugestão está implícita no comentário do docente 4:] *faltam questões que levem o aluno a de fato utilizar dados obtidos em experimentos anteriores para planejar o experimento seguinte.*

Entende-se que as declarações docentes indicaram a preocupação com a qualidade dos conteúdos apresentados. Porém, apesar das deficiências apontadas, o objetivo central das aulas foi alcançado por promover a discussão através de questões geradoras. Assim as perguntas diretivas tinham a intenção de fazer

emergir certos conhecimentos para facilitar e aumentar a qualidade das discussões entre estudantes e orientadores.

2. Outros docentes ressaltaram aspectos relativos à **qualidade, comportamento e empenho discente** nas aulas.

> ***As aulas de planejamento melhoraram nesta segunda edição do curso.*** *Entretanto, ainda há falhas, derivadas principalmente da morosidade com que os grupos de trabalho executam o planejamento. É evidentemente uma falta de prática. A situação melhora até o segundo terço do curso, mas depois volta a se deteriorar em função de um certo cansaço dos alunos com o curso e com a sobrecarga de aulas a que estão sujeitos na FCF* [Faculdade de Ciência Farmacêuticas] (2).
>
> *(...) Foi difícil motivar os alunos nestas atividades, pois a leitura prévia com atenção de longos procedimentos práticos pode ser bastante maçante. Isto possivelmente foi agravado pelo fato de tratar-se de um curso noturno, onde a motivação dos alunos pode ser menor pelo cansaço (...) Mesmo quando as respostas às questões requeriam o uso de senso comum apenas, os alunos naturalmente esperavam uma confirmação de suas respostas pelo professor ou monitor, mas havia um número elevado de perguntas por atividade e apenas duas pessoas para discutir as respostas.*
>
> *Especialmente no início do curso notei que nem todas as questões do planejamento eram discutidas com a atenção desejável e mesmo assim alguns alunos deixavam a sala antes do final do período por estarem cansados (...)* (3).
>
> *Penso que as aulas de planejamento deveriam levar o aluno a entender de forma crítica o experimento que será realizado. Este objetivo é apenas parcialmente atingido devido à deficiências conceituais dos alunos (...)*(4).
>
> *(...) muitas vezes pude perceber que isto só era válido* [as aulas de Planejamento atingirem os objetivos propostos] *para uma parcela dos estudantes: aqueles que conseguiram captar a filosofia da disciplina ou que genuinamente se interessavam pelos tópicos nela abordados* (5).

A inexperiência discente é o principal comentário dos docentes. Tentativas de explicações foram dadas, tais como *falta de prática* (3), *cansaço* (3). Para o curso noturno são apontadas *deficiências conceituais* (4). O docente 5 também apontou que somente os estudantes que *conseguiram captar a filosofia da disciplina ou que genuinamente se interessavam pelos tópicos nela abordados* puderam realizar as aulas, atingindo os objetivos propostos.

3. O docente 3 apresentou uma **tentativa de solucionar as deficiências da aula**. Infelizmente, durante as discussões realizadas todas as semanas antes das aulas, o

docente não compartilhou esse fato, talvez por temer estar saindo dos objetivos da disciplina, como declarou. Fato pitoresco é essa tentativa de solução também ser proposta em outras turmas, sem que houvesse comunicação entre os docentes e o desenvolvedor deste projeto.

> *Na tentativa de solucionar estes problemas, passei a fazer uma pequena preleção antes do planejamento, apesar de entender que isto não era coerente com a filosofia pedagógica do curso. Acho que estas preleções facilitaram a resolução das questões do planejamento. Minha sugestão para uma futura edição do curso é que estas informações introdutórias adicionais sejam fornecidas na apostila do curso ou na forma de material didático complementar.*

Da mesma forma como o docente apontou, preleções foram realizadas em outras turmas (seção 3.3.3, p. 36). Essa preleção – no entendimento da filosofia da disciplina – foi totalmente coerente com a sua aplicação. Infelizmente não se dispõe de mais informações sobre a preleção realizada pelo docente, mas as aplicadas nas outras turmas situavam o estudante no andamento do projeto, pois sumarizavam o que tinha sido feito anteriormente e o que seria realizado no dia, oferecendo aos estudantes uma trajetória do projeto.

4. O docente 4 declarou que as aulas de Planejamento atingiram parcialmente seus objetivos, apontando eventuais causas desse sucesso parcial.

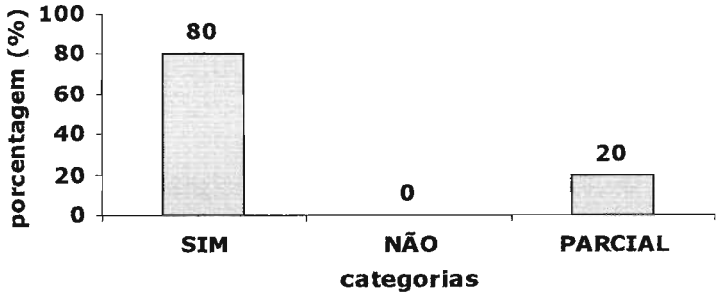
> ***Parcialmente. Penso que as aulas de planejamento deveriam levar o aluno a entender de forma crítica o experimento que será realizado.*** *Este objetivo é apenas parcialmente atingido devido à deficiências conceituais dos alunos, dificuldade dos professores e monitores em identificar estas deficiências, falta de tempo e material adequado para superar as deficiências conceituais.*

Conforme discutido antes, as aulas tiveram virtudes e deficiências. A preocupação com os conteúdos da apostila deriva, provavelmente, do fato de a maior parte dos docentes também vem de uma escolaridade e vida acadêmica conteudista. Os docentes apontaram também outras causas para as aulas não atingirem o sucesso pretendido. Estas justificativas são endossadas pelas observações realizadas durante o decorrer das disciplinas.

4.20. AS AULAS DE TD+AR (TRATAMENTO DE DADOS + ANÁLISE DOS RESULTADOS) ATINGIRAM OS OBJETIVOS PROPOSTOS? (Questão 9 – Questionário 4)

Para as aulas de TDAR foi possível classificar as respostas dos docentes. Três docentes responderam afirmativamente (Categoria I). A resposta do docente 2, pelo seu conteúdo, foi enquadrada na Categoria I. Somente um respondeu parcialmente (Categoria III). (Figura 24).

Figura 24 – Distribuição das respostas da Questão 9 do Questionário 4 (cinco professores)



4.20.1 CATEGORIA I – SIM

1. O docente 1 não fez nenhum comentário, somente respondeu: *acho que sim.*

2. O docente 2 **relacionou as aulas de TDAR com as de Planejamento**, apontando uma importante qualidade das aulas de TDAR.

> *As aulas de TD+AR sofrem dos mesmos problemas apontados na pergunta 8, mas a meu ver, foram fundamentais para sedimentar o conhecimento obtido no laboratório.*

3. O docente 5 respondeu de forma semelhante a questão sobre as aulas de Planejamento, ou seja, quanto à **qualidade, comportamento e empenho discente** nas aulas.

> *Acredito que sim. Por outro lado, muitas vezes pude perceber que isto só era válido para uma parcela dos estudantes: aqueles que de fato se envolveram com a realização dos experimentos.*

4. O docente 3 fez considerações apontando algumas **intercorrências a respeito dos estudantes**.

De forma geral sim. ***O único problema a relatar foi a divisão dos procedimentos/resultados entre grupos e subgrupos.*** *Devido ao grande número de membros dos grupos e à heterogeneidade de dedicação dos subgrupos de um mesmo grupo aconteceram alguns desentendimentos entre os estudantes nestas atividades em pelo menos dois dos quatro grupos.* ***Alguns alunos reclamaram desta forma de divisão dos trabalhos.*** *Estas dificuldades deveriam ser contornadas pela minha atuação juntamente com o monitor, mas isto nem sempre ocorreu por falta de tempo, ou mesmo falta de interesse dos alunos.* ***Estes problemas tiveram reflexo sobre os relatórios entregues, onde foi percebi deficiências quando havia necessidade de integrar os resultados de diferentes subgrupos.***

4.20.2. CATEGORIA III – PARCIALMENTE

Da mesma forma como respondeu a questão anterior, o docente 4 apontou a deficiência conceitual dos estudantes como um dos motivos de se atingir parcialmente os objetivos da aulas de TDAR, sugerindo as causas dessas deficiências.

Parcialmente. O tratamento e análise dos resultados deveriam levar o aluno a uma interpretação crítica do experimento, formulação de hipóteses, proposição de novos experimentos, correlação com conceitos teóricos. Estes objetivos não são totalmente alcançados devido às deficiências conceituais dos alunos. As causas dessas deficiências talvez passem pela falta de tempo, material, experiência dos professores e monitores e motivação dos alunos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É lícito afirmar que, segundo indica o conjunto de respostas dos participantes, a disciplina Bioquímica Experimental cumpriu seus objetivos principais, ou seja, simular um projeto de pesquisa e, com isto, contribuir para o desenvolvimento das habilidades pretendidas. Em decorrência destes resultados, e após essa experiência, alunos, monitores e professores declararam preferir participar de disciplinas simuladoras.

A alteração de uma disciplina prática clássica para uma simulação de um projeto de pesquisa pressupõe uma mudança nos papéis a serem desempenhados por todos os participantes do processo, contrariando suas atuações convencionais. Dito de outra forma, o chamado ***contrato pedagógico*** precisa ser lavrado em novos termos, baseado em parcerias:

- entre professores e monitores, com grande autonomia dos últimos sobre a ação nos grupos de discussão. Os monitores foram efetivamente requeridos durante as aplicações das disciplinas e, para isso, foi necessário o seu treinamento antes e no decorrer da disciplina;
- entre orientadores e estudantes: a alteração de comportamento dos orientadores (passando de transmissores para facilitadores) e dos estudantes (passando de receptores a agentes responsáveis pelas suas aprendizagens) não é trivial nem imediata.

Adotar um modelo de disciplina que, de certa maneira, inverte papéis solidamente estabelecidos inclui aceitar que os participantes não têm experiência anterior e que aprenderão durante o processo.

Trabalhou-se nessa disciplina, como em toda pesquisa, com fatos e situações **reais**, e não **ideais**.

Apesar de se contar com um corpo discente em princípio motivado para a aprendizagem de Bioquímica (devido à escolha do curso de graduação em Ciências Farmacêuticas) o interesse dos estudantes é desigualmente distribuído. A adesão à nova forma de aprender foi, por isto, também heterogênea, uns poucos alunos tardando mais a assumir uma atitude ativa e investigativa.

Nem todos os professores e monitores estavam plenamente seguros da aplicabilidade da estratégia e da eficácia desta forma não-tradicional de ensino prático. Mas há que ressaltar a dedicação, boa-vontade, empenho e disponibilidade da maioria deles para abandonar a segurança proporcionada por uma forma de ensino na qual haviam reunido uma experiência preciosa e dedicar a este projeto um

tempo muito maior do que o que seria destinado ao desenvolvimento de uma disciplina clássica.

Há que se considerar que esse projeto, como tantos outros, tem uma vasta continuidade pela frente, caso haja interesse. É, portanto, um trabalho aberto, com variantes que podem ser exploradas e alteradas. Parece, entretanto, ser uma alternativa viável e construtiva para aqueles que se dispuseram a enfrentar a necessária mudança de postura que, segundo os especialistas da área, contribuirá para formar o cidadão crítico que todos desejamos.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

BIBLIOGRAFIA

BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

QBQ 0216

Departamento de Bioquímica

INSTITUTO DE QUÍMICA

Professores

DIURNO
Pedro Soares de Araújo
Maria Terêsa Machini de Miranda
Iolanda Midea Cuccovia

NOTURNO
Sandro Roberto Marana
Ricardo Peres do Souto

Monitores

DIURNO
Elvis Medeiros de Aquino
Helena Couto Junqueira
Maria Dulcetti Vibranovski
Paula Rezende Teixeira
Tereza Pereira de Souza

NOTURNO
***Mig* Fernando Ariel Genta**
Larissa Martins Gonçalves

Colaborador

Remo Trigoni Júnior

Horário e Programação
DIURNO

Mês	Dia	Período	Conteúdo	Prática	Avaliações
Ago	6	Manhã	**Planejamento Geral: PROJETO** **Planejamento 1**		
		Tarde	**Planejamento 1** **Preparo do meio de cultura**	P1	
	12		**Inoculação do meio de cultura**	P2	
	13	Manhã	**Curva de crescimento e dosagens de glicose e etanol**	P3, P4, P5	
		Tarde	**Curva de crescimento e dosagens de glicose e etanol**	P3, P4, P5	
	20	Manhã	**TDAR 1**		
		Tarde	**Planejamento 2**	P6	
	27	Manhã	**Fracionamento celular** **Dosagem de proteína** **Determinação da atividade enzimática**	P7, P8	***Relatório 1***
		Tarde	**TDAR 2** **Planejamento 3**		
Set	10	Manhã	**Caracterização da enzima: K_m e V_{max}** **Caracterização da enzima: determinação do K_i**	P9, P10	
		Tarde	**Preparo de Tampões** **Caracterização da enzima: pH**	P11, P12	
	17	Manhã	**TDAR 3**		
		Tarde	**Planejamento 4** **Software: Cromatografias**		
	24	Manhã	**Precipitação com $(NH_4)_2SO_4$**	P13	***Relatório 2***
		Tarde			***Prova 1***
Out	1	Manhã	**TDAR 4** **Planejamento 5**		
		Tarde	**Cromatografia de troca iônica**	P14	
	8	Manhã	**Cromatografia de troca iônica**	P14	
		Tarde	**TDAR 5**		
	15		**Semana da Farmácia**		
	22	Manhã	**Planejamento 6** **Eletroforese**	P15	
		Tarde	**Eletroforese**	P15	
	29	Manhã	**Eletroforese** **TDAR 6** **Planejamento 7**	P15	
		Tarde	**Seqüenciamento de proteinas**	P16	
Nov	5	Manhã			***Relatório 3*** ***Prova 2***
		Tarde	**Planejamento 8** **Membranas**	P17	
	12	Manhã	**Membranas**	P17	
		Tarde	**Cadeia de Transporte de Elétrons** **TDAR 7**	P18	
	19	Manhã	**Planejamento 9**		
		Tarde	**Regulação de metabolismo**	P19	
	26	Manhã	**Regulação de metabolismo**	P19	
		Tarde	**TDAR 8**		
Dez	3	Manhã			***Relatório 4*** ***Prova 3***
		Tarde	**Tecnologia de panificação**	P20	

Horário e Programação
NOTURNO

Mês	Dia	Conteúdo	Prática	Avaliações
Ago	5	**Planejamento Geral: PROJETO** **Planejamento 1**		
	8	**Planejamento 1** **Preparo do meio de cultura**	P1	
	11/14	**Inoculação do meio de cultura**	P2	
	12	**Curva de crescimento e dosagens de glicose e etanol**	P3, P4, P5	
	15	**Curva de crescimento e dosagens de glicose e etanol**	P3, P4, P5	
	19	**TDAR 1**		
	22	**Planejamento 2**	P6	
	26	**Fracionamento celular** **Dosagem de proteína** **Determinação da atividade enzimática**	P7, P8	
	29	**TDAR 2** **Planejamento 3**		
Set	9	**Caracterização da enzima: K_m e V_{max}** **Caracterização da enzima: determinação do K_i**	P9, P10	***Relatório 1***
	12	**Preparo de Tampões** **Caracterização da enzima: pH**	P11, P12	
	16	**TDAR 3**		
	19	**Software: Cromatografias**		
	23	**Planejamento 4**	P13	
	26	**Precipitação com $(NH_4)_2SO_4$**		
	30	**TDAR 4** **Diálise**		***Relatório 2***
Out	3			***Prova 1***
	7	**Planejamento 5**		
	10	**Cromatografia de troca iônica**	P14	
	14/17	**Semana da Farmácia**		
	21	**Cromatografia de troca iônica**	P14	
	24	**TDAR 5** **Planejamento 6**		
	28	**Eletroforese**	P15	
	31			***Prova 2***
Nov	4	**Planejamento 7**		
	7	**Seqüenciamento de proteinas**	P16	
	11	**Planejamento 8**		***Relatório 3***
	14	**Membranas**	P17	
	18	**Planejamento: Ponto de ação de drogas na CTE**		
	21	**Cadeia de Transporte de Elétrons**	P18	
	25	**TDAR 7**		
	28			***Prova 3***
Dez	2	**Tecnologia de panificação**	P20	***Relatório 4***

Peso de provas e critérios de aprovação

Avaliações		Pesos
Reiatório 1	R1	1
Relatório 2	R2	2
Relatório 3	R3	3
Relatório 4	R4	4
Prova 1	P1	10
Prova 2	P2	20
Prova 3	P3	30

$$\text{Média Final} = \frac{(R1x1) + (R2x2) + (R3x3) + (R4x4) + (P1x10) + (P2x20) + (P3x30)}{70}$$

Índice

módulo		página
	Planejamento do projeto	6
Módulo 1 Crescimento Celular	**Planejamento 1** -Curva de crescimento e Dosagens	7
	Prática 1 - Preparo de Meio de Cultura	11
	Prática 2 - Inoculação em Meio de Cultura	12
	Prática 3 - Curva de Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*	13
	Prática 4 - Dosagem de Glicose	15
	Prática 5 - Dosagem de Etanol	17
	TDAR 1 - P1 a P5	18
Módulo 2 Caracterização da Enzima	**Planejamento 2** - Dosagem de proteínas e determinação da atividade enzimática	21
	Prática 6 - Fracionamento Celular	23
	Prática 7 - Dosagem de Proteínas	25
	Prática 8 - Determinação da Atividade Enzimática	27
	TDAR 2 - P6 a P8	29
	Planejamento 3 - Caracterização de enzimas	31
	Prática 9 - Caracterização de Enzimas - K_m e V_{max}	32
	Prática 10 - Caracterização de Enzimas - determinação do K_i	34
	Prática 11 - Preparo de Tampões	36
	Prática 12 - Caracterização de Enzimas - pH ótimo	37
	TDAR 3 - P9 a P12	39
Módulo 3 Purificação da Enzima	**Planejamento 4** - Precipitação com $(NH_4)_2SO_4$	43
	Prática 13 - Purificação de Proteínas - precipitação com sulfato de amônio	45
	TDAR 4 - P13	49
	Planejamento 5 - Cromatografia de Troca Iônica	50
	Prática 14 - Purificação de Proteínas - cromatografia de troca iônica	51
	TDAR 5 - P14	56
	Planejamento 6 - Eletroforese	57
	Prática 15 - Purificação de Proteínas - eletroforese	59
	TDAR 6 - P15	62
Módulo 4 Compartimentos e metabolismo	**Planejamento 7** - Seqüenciamento de Proteínas	63
	Prática 16 - Seqüenciamento de Proteínas - cromatografia em camada delgada	64
	Planejamento 8 - Membranas	67
	Prática 17 - Membranas - compartimentalização de azul de metileno em vesículas unilamelares de fosfatidilcolina	68
	Prática 18 - Cadeia de Transporte de Elétrons - determinação do ponto de ação de drogas	71
	TDAR 7 - P16 a P18	75
	Planejamento 10 - Regulação do Metabolismo	76
	Prática 19 - Regulação do Metabolismo - sinal de glicose e ativação da trealase	77
	TDAR 8 - P19	80
	Prática 20 - Tecnologia de Panificação	81

Planejamento Geral - Projeto

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA MACROMOLÉCULA

A disciplina *QBQ-0216 – Bioquímica Experimental* tem como objetivo principal simular uma pesquisa laboratorial. Para qualquer pesquisa ser feita, é necessário que inicialmente haja uma pergunta, um problema a ser resolvido.

PROBLEMA - Algumas macromoléculas estão presentes ao longo de toda a vida dos organismos (constitutivas). Outras apenas surgem em determinadas fases do seu ciclo de vida (indutíveis). Estudar algumas dessas macromoléculas pode ser de interesse para elucidar muitos dos mecanismos que regulam a vida do organismo.

OBJETIVO – Selecionada uma macromolécula indutível a ser utilizada como modelo, fazer um projeto para isolar, caracterizar e purificar a molécula.

Esboçar um fluxograma relativo à caracterização e purificação da macromolécula selecionada. Abaixo segue uma série de itens que devem ser examinados e discutidos entre colegas e coordenadores para a construção do fluxograma.

1. Por que *estudar* uma macromolécula?
2. Quais as macromoléculas existentes em qualquer organismo?
3. Quais as funções biológicas das macromoléculas?
4. Que tipo de organismo você escolheria?
5. Qual o método de escolha desse organismo?
6. Que tipos de vantagens haveria na escolha desse organismo?
7. Existe alguma diferença entre caracterização e purificação? Uma etapa depende da outra?
8. Como você definiria *caracterização de uma macromolécula*?
9. Por que *caracterizar* uma macromolécula?
10. Como uma macromolécula pode ser caracterizada?
11. Como você definiria *purificação de uma macromolécula*?
12. Por que *purificar* uma macromolécula?

APÓS TERMINAR O FLUXOGRAMA ESCREVER NUMA FOLHA E ENTREGAR PARA OS MONITORES

- OS PONTOS QUE VOCÊ CONSIDERA COMO SENDO IMPORTANTE NO PROJETO;
- AS DÚVIDAS E QUESTÕESQUE VOCÊ NÃO SOUBE RESPONDER;

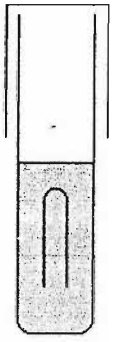
AS PERGUNTAS SERÃO RETOMADAS AO LONGO DO PROJETO PARA SEREM RESPONDIDAS

Planejamento 1

PRÁTICA 1 - PREPARO DE MEIO DE CULTURA
PRÁTICA 2 - INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA
PRÁTICA 3 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
Questões para Discussão

1. Um experimento foi realizado visando entender o crescimento de leveduras em meios de cultura. Diversos tubos de ensaio foram preparados com diferentes valores de pH, conforme a tabela abaixo. No interior desses tubos de ensaio foram colocados, invertidos, tubos menores, denominados tubos de Durham (esquema abaixo). Quando autoclavados, o ar no interior dos tubos de Durham é expelido e substituído pelo meio de cultura. Todos os tubos foram inoculados em condições ideais de crescimento. Após certo tempo verificaram-se mudanças no meio, conforme mostrado na tabela:

tubo de Durham no interior de tubo de ensaio



tubos	pH inicial	pH resultante	turvação do meio	surgimento de gás
1	1,0	1,0	-	-
2	2,0	2,0	-	-
3	3,0	3,0	-	-
4	4,0	5,0	+	+
5	5,0	5,0	+ + +	+ + +
6	6,0	5,0	+ +	+ +
7	7,0	7,0	-	-
8	8,0	8,0	-	-
9	9,0	9,0	-	-

   a. Que tipos de alterações pode-se verificar na tabela?
   b. Há algum tipo de relação entre a turvação do meio e o surgimento do gás? Fazer hipóteses.
   c. Que gás poderia ser esse? Há algum meio de analisá-lo?
   d. Há algum tipo de relação entre a turvação do meio e o surgimento do gás com o pH resultante? Estabelecer relações.

Discussão das Práticas 1, 2 e 3

2. Na *Prática 1*, indicar as funções de cada um dos componentes do meio de cultura:
   a. glicose.
   b. peptona.
   c. extrato de levedura.
3. Por que a autoclavagem do meio é necessária? O que aconteceria se o meio de cultura não fosse autoclavado?
4. Da mesma forma, o que aconteceria se o valor de pH do meio não fosse ajustado para 5?
5. Na *Prática 2*, por que a alça de platina deve ser esterilizada?
6. A alça de platina é resfriada na parede interna do tubo contendo levedura em meio de cultura sólido. Por que?
7. Quais as diferenças do crescimento de células em meios sólidos e líquidos? Existem vantagens/desvantagens para cada meio? Quais?
8. Por que a levedura é crescida inicialmente em meio sólido e depois em meio líquido?
9. Por que o meio de cultura deve ser agitado?
10. Por que o meio de cultura deve ser mantido a 28°C?
11. Para que serve o *fator da levedura* (fator de massa seca)?
12. Na *Prática 3*, utiliza-se um processo denominado centrifugação. Qual o princípio da centrifugação?
13. Para quê a centrifugação é necessária na *Prática 3*?
14. Por que as amostras devem ser mantidas em banho de gelo?
15. Citar as diversas formas de verificar o crescimento de um microrganismo.
16. Na *Prática 3*, qual a forma de verificar se a levedura está crescendo?

PRÁTICA 4 - DOSAGEM DE GLICOSE
PRÁTICA 5 – DOSAGEM DE ETANOL
Questões para Discussão

17. Para a reação A + B → C, sabe-se que A e B não são coloridos, mas C é colorido. É possível utilizar essa reação para mensurar A ? Por que?
18. O que ocorrerá na quantificação de A se B >> A?
19. E o que ocorrerá na quantificação de A se B << A?
20. Esboçar um gráfico que relacione *concentração de C* versus *tempo de reação*.
21. Haveria algum problema se um dos reagentes também fosse colorido?
22. Como se contornaria esse problema?
23. Num laboratório existem várias amostras de C de concentrações desconhecidas. Como poderíamos descobrir suas concentrações?
24. Que tipo de relação pode ser feita para a descoberta de concentrações desconhecidas?
25. Como se denomina o gráfico que expressa esse tipo de relação?
26. Qual o aspecto do gráfico que relaciona a concentração de C e a intensidade de cor dessa substância?
27. Por que é necessário um branco toda vez que se faz essa padronização?
28. Para outra reação A + D → E, o produto E não é colorido. Como fazer para detectar A?
29. Como fazer para escolher o melhor comprimento de onda para medir a absorbância do produto de reação?
30. Quais os passos experimentais necessários para construir um gráfico que relacione *absorbância* versus *massa seca de células* de leveduras?
31. Qual a relação entre o gráfico e o *fator de levedura* (fator de massa seca)?

Discussão das *Práticas 4 e 5*

32. Que reação gera um produto colorido na *Prática 4*?
33. Indicar a função dos seguintes reagentes da *Prática 4*:
    a. solução de glicose 5 mM.
    b. solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) 10 g/L.
34. Qual reagente deve estar em excesso ? Por que?
35. Por que é necessário diluir o meio de cultura antes de dosar glicose?
36. Se o valor de absorbância da sua amostra está fora dos limites da curva padrão, o que deve ser feito para obter resultados confiáveis?
37. Como é selecionado o comprimento de onda para a leitura do produto da reação de DNS e glicose?
38. Na *Prática 4*, qual a função da água nas Tabela 1 e 3?

Divisão de Grupos e Atividades - **Diurno**

Grupo	**06/Ago**	**12/Ago**
A1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-24**	Inocular às **9h**
B1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-18**	Inocular às **15h**
C1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-12**	Inocular às **21h**
D1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-24**	Inocular às **9h**
E1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-18**	Inocular às **15h**
F1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-12**	Inocular às **21h**
G1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-24**	Inocular às **9h**
H1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-18**	Inocular às **15h**
I1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-12**	Inocular às **21h**

Grupo		**13/Ago**					
		8h	**9h**	**11h**	**13h**	**15h**	**17h**
X	**X1**	-	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.
	X2/X3	Fazer a curva padrão de glicose	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.
	X2/X3	Fazer a curva padrão de etanol	Receber os sobrenadantes das culturas nos tempos previstos e dosar etanol.				

Divisão de Grupos e Atividades - **Noturno**

Grupo	**08/Ago**	**11/Ago**	**12/Ago**
A1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-24**	Inocular às **19h**	
B1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-18**		Inocular às **1h da manhã**
C1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-12**		Inocular às **7h da manhã**
D1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-24**	Inocular às **19h**	
E1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-18**		Inocular às **1h da manhã**
F1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-12**		Inocular às **7h da manhã**
G1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-24**	Inocular às **19h**	
H1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-18**		Inocular às **1h da manhã**
I1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-12**		Inocular às **7h da manhã**

Grupo		**12/Ago**		
		19h	**21h**	**23h**
X	**X1**	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.
	X2/X3	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1**.
	X2/X3	Receber os sobrenadantes das culturas nos tempos previstos e dosar etanol.		

Grupo	**14/Ago***	**14/Ago**	**15/Ago**
A1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-24**	Inocular às **14h**	
B1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-18**	Inocular às **22h**	
C1	Preparar meio de cultura – Rotular: **ABC-12**		Inocular às **2h da manhã**
D1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-24**	Inocular às **14h**	
E1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-18**	Inocular às **22h**	
F1	Preparar meio de cultura – Rotular: **DEF-12**		Inocular às **2h da manhã**
G1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-24**	Inocular às **14h**	
H1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-18**	Inocular às **22h**	
I1	Preparar meio de cultura – Rotular: **GHI-12**		Inocular às **2h da manhã**

* – Não há necessidade dos alunos fazerem essa prática novamente

Grupo		**15/Ago**		
		19h	**20h**	**22h**
X	**X1**	-	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.	Retirar 5 mL de alíquota das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24. Medir as absorbâncias, centrifugar e dar metade do volume para o grupo **X2** e metade para o grupo **X3**, com os rótulos ABC-12, ABC-18 e ABC-24.
	X2/X3	Dosar glicose das amostras guardadas na aula anterior.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.	Receber os sobrenadantes das culturas ABC-12, ABC-18 e ABC-24 do grupo **X1** e dosar glicose.
	X2/X3	Receber os sobrenadantes das culturas nos tempos previstos e dosar etanol.		

Prática 1
Preparo de Meio de Cultura

Objetivo
Preparar meio de cultura para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes	Materiais	Aparelhagens
ácido clorídrico	barras magnéticas	agitador magnético
água destilada	béqueres	autoclave
extrato de levedura	erlenmeyers	balança
glicose	espátulas	pHmetro
peptona	papel alumínio	
	pipetas de Pasteur	
	provetas	
	suportes para tubos de ensaio	
	tampões de algodão	

Procedimento

MEIO DE CULTURA
COMPOSIÇÃO: extrato de levedura 20 g/L, peptona 20 g/L, glicose 50 g/L
VALOR DE pH = 5,0
VOLUME = 150 mL

1. Pesar as substâncias num béquer adequado:
   a. extrato de leveduras: 2% - 3 g
   b. peptona: 2% - 3 g
   c. glicose: 5% - 7,5 g.
2. Adicionar água destilada até 80% do volume estipulado (120 mL).
3. Agitar até a dissolução total das substâncias.
4. Ajustar o valor de pH da solução resultante para 5,0 por adição de ácido clorídrico, utilizando o pHmetro.
5. Transferir a solução para uma proveta e completar para 100% do volume (150 mL).
6. Transferir o meio para um erlenmeyer de 500 mL.
7. Fechar o erlenmeyer com um tampão de algodão.
8. Envolver tampão de algodão e a boca do erlenmeyer com papel alumínio.
9. Autoclavar a 120°C por 20 min.

Prática 2
Inoculação em Meio de Cultura

Objetivo
Inocular *Saccharomyces cerevisiae* em um meio de cultura.

Reagentes
água destilada
meio de cultura ***ESTÉRIL*** (***P1***)
tampão fosfato 50 mM pH 6,0 ***ESTÉRIL***
tubo contendo levedura em meio sólido

Materiais
alças de platina
bicos de Bunsen
cubetas para leitura
pipetadores
ponteiras ***ESTÉREIS***
suporte para tubos de ensaio
tubos Falcon de 10 mL ***ESTÉREIS***

Aparelhagens
agitador (*shaker*)
espectrofotômetro

Procedimento

1. Esterilizar a alça de platina na chama do bico de Bunsen aceso.
2. Esfriá-la na parede interna do tubo com o meio contendo levedura crescida em meio sólido.
3. Retirar com a ponta da alça de platina um pouco de levedura, e, próximo à chama, transportar a levedura para um tubo Falcon de 10 mL contendo 5 mL de tampão fosfato esterilizado.
4. Próximo à chama, suspender a levedura no tampão.
5. Ainda próximo à chama, retirar uma alíquota de 300 μL da suspensão, utilizando uma ponteira estéril, e colocá-la na cubeta de leitura.
6. Adicionar 2,7 mL de água destilada na cubeta.
7. Ler a absorbância a 570 nm.
8. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
9. Calcular a concentração de levedura em μg/mL
10. Inocular 0,2 μg de células de levedura por mL (mililitro) de meio de cultura estéril.
11. Próximo à chama, com uma ponteira ***estéril***, inocular o volume calculado no meio de cultura.
12. Levar o erlenmeyer ao agitador (*shaker*).
13. Estabelecer no agitador as seguintes condições:
    a. Freqüência: 90 rpm.
    b. Temperatura: 28°C.

Cálculo da concentração de levedura

1. Para que a concentração de levedura seja dada em **μg/mL**:
   ABSORBÂNCIA (570 nm) X **10** (diluição) X **0,69** (fator da levedura) X 1000
2. Para que a concentração de levedura seja dada em **mg/mL**:
   ABSORBÂNCIA (570 nm) X **10** (diluição) X **0,69** (fator da levedura)

Prática 3
Curva de Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

Objetivo
Construir uma curva de crescimento de *S. cerevisiae.*

Reagentes
meios de cultura inoculados (***P2***)

Materiais
banho de gelo
bicos de Bunsen
erlenmeyers (***P1***)
pipetas
pipetas ***ESTÉREIS***
pipetadores
suportes para tubos de ensaio
tubos de centrífuga
tubos de ensaio

Aparelhagens
centrífuga
espectrofotômetro

Procedimento

INSTRUÇÕES:
- A curva de crescimento será construída utilizando-se o conteúdo de três erlenmeyers: X, Y e Z.
- Os erlenmeyers X, Y e Z foram incubados por tempos diferentes – 12h, 18h e 24h, respectivamente.
- Retirar amostras após os tempos de incubação indicados na **Tabela 1**.
- O gráfico da curva de crescimento de leveduras deverá conter todos os pontos coletados entre 12 e 32 horas de incubação, como indicado na **Tabela 1**.

Tabela 1

frascos		tempos de incubação (horas)										
X	12h-20h	12	14	16	18	20	-	-	-	-	-	-
Y	18h-26h	-	-	-	18	20	22	24	26	-	-	-
Z	24h-32h	-	-	-	-	-	-	24	26	28	30	32

1. Nos horários estabelecidos, retirar alíquotas de 5 mL de cada um dos erlenmeyers de cultura em ambiente estéril, ou seja, próximo à chama do bico de Bunsen.
2. Adicionar na cubeta de leitura os volumes de meio de cultura e água estipulados na **Tabela 2**.
3. Homogeneizar.
4. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
5. Ler a absorbância do material a 570 nm.
6. Centrifugar o material a 1500x *g* por 10 min.
7. Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio.
8. Manter as amostras em banho de gelo.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Tabela 2

frascos		alíquotas	tempos de incubação (h)	volume necessário em cada cubeta = 3000 µL		diluição	A_{570}	A_{570} ***corr.*** (A_{570} x dil)
				volume de amostra (µL)	volume de água (µL)			
X	**12h-20h**	X1	12	1000	2000	3 X		
		X2	14	300	2700	10 X		
		X3	16	150	2850	20 X		
		X4	18	150	2850	20 X		
		X5	20	150	2850	20 X		
Y	**18h-26h**	Y1	18	300	2700	10 X		
		Y2	20	100	2900	30 X		
		Y3	22	75	2925	40 X		
		Y4	24	75	2925	40 X		
		Y5	26	75	2925	40 X		
Z	**24h-32h**	Z1	24	300	2700	10 X		
		Z2	26	75	2925	40 X		
		Z3	28	75	2925	40 X		
		Z4	30	75	2925	40 X		
		Z5	32	75	2925	40 X		

Prática 4
Dosagem de Glicose

Objetivo
Construir uma curva de dosagem de glicose durante o crescimento de uma cultura de leveduras.

Reagentes
água destilada
ácido dinitrosalicílico (DNS) 10g/L
glicose 5 mM
meios de cultura inoculados (***P2***)

Materiais
pipetas
suporte para tubos de ensaio
tubos de ensaio grandes

Aparelhagens
banho fervente
espectrofotômetro
vórtice

Dados
solução de glicose 5 mM = 5 mmols/L = 5 µmols/mL
massa molar da glicose = 180 g/mol

Procedimento A – Curva padrão de glicose

1. Adicionar em cada tubo os volumes de água e glicose estipulados na **Tabela 1**.
2. Adicionar o DNS.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Colocar os tubos em banho fervente por 10 min.
5. Esfriar os tubos em água corrente.
6. Adicionar em cada tubo 4 mL de água destilada.
7. Homogeneizar.
8. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
9. Ler as absorbâncias a 540 nm.
10. Completar a **Tabela 2**.
11. Construir a curva padrão de glicose.

Tabela 1

tubos	glicose 5 mM (mL)	água (mL)	DNS 10 g/L (mL)
branco	0,00	0,50	0,50
1	0,05	0,45	0,50
2	0,10	0,40	0,50
3	0,15	0,35	0,50
4	0,20	0,30	0,50
5	0,25	0,25	0,50
6	0,30	0,20	0,50
7	0,35	0,15	0,50
8	0,40	0,10	0,50
9	0,45	0,05	0,50
10	0,50	0,00	0,50

Tabela 2

tubos	massa glicose (mg)	A_{540}	A_{540} ***corrigida***
branco			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Procedimento B – Dosagem de glicose durante o crescimento de uma cultura de leveduras

OBSERVAÇÃO: para esse procedimento é necessário que todas as amostras de glicose sejam diluídas de acordo com a **Tabela 3**. Para isso segue o procedimento para diluição:

DILUIÇÃO 2 X Transferir 0,5 mL da amostra para um tubo de ensaio.
Adicionar 0,5 mL de água destilada.
Homogeneizar.
Identificar o tubo de ensaio com **2X**.

DILUIÇÃO 20 X Transferir 0,1 mL da amostra para um tubo de ensaio.
Adicionar 1,9 mL de água destilada.
Homogeneizar.
Identificar o tubo de ensaio com **20X**.

1. Adicionar em cada tubo os volumes de água e amostras de meio de cultura (devidamente diluídas) estipulados na **Tabela 3**.
2. Adicionar o DNS.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Colocar os tubos em banho fervente por 10 min.
5. Esfriar os tubos em água corrente.
6. Adicionar em cada tubo 4 mL de água destilada.
7. Homogeneizar.
8. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
9. Ler as absorbâncias a 540 nm.
10. Completar a **Tabela 4**.
11. Construir a curva de dosagem de glicose durante o crescimento da cultura de leveduras.

OBSERVAÇÃO: Caso a absorbância esteja fora dos limites da curva padrão, repetir a dosagem com as modificações necessárias para que a absorbância fique dentro dos limites da curva padrão.

Tabela 3

frascos		tempos (h)	tubos	diluições	amostras de meio de cultura (mL)	água (mL)	DNS 10 g/L (mL))
X	**12h-20h**	12	X1	20 X	0,125	0,375	0,50
		14	X2	20 X	0,125	0,375	0,50
		16	X3	20 X	0,125	0,375	0,50
		18	X4	20 X	0,125	0,375	0,50
		20	X5	20 X	0,125	0,375	0,50
Y	**18h-26h**	18	Y1	20 X	0,125	0,375	0,50
		20	Y2	20 X	0,125	0,375	0,50
		22	Y3	2 X	0,125	0,375	0,50
		24	Y4	2 X	0,125	0,375	0,50
		26	Y5	2 X	0,125	0,375	0,50
Z	**24h-32h**	24	Z1	2 X	0,125	0,375	0,50
		26	Z2	2 X	0,125	0,375	0,50
		28	Z3	2 X	0,125	0,375	0,50
		30	Z4	2 X	0,125	0,375	0,50
		32	Z5	2 X	0,125	0,375	0,50

Tabela 4

tubos	A_{540}	A_{540} ***corr.***
X1		
X2		
X3		
X4		
X5		

tubos	A_{540}	A_{540} ***corr.***
Y1		
Y2		
Y3		
Y4		
Y5		

tubos	A_{540}	A_{540} ***corr.***
Z1		
Z2		
Z3		
Z4		
Z5		

Prática 5
Dosagem de Etanol

Objetivos
Construir uma curva de dosagem de etanol durante o crescimento de uma cultura de leveduras.

Reagentes	**Materiais**	**Aparelhagens**
meios de cultura inoculados (***P2***)	béqueres	centrífuga
	bicos de Bunsen	
	densímetros (alcoômetros)	
	provetas	
	tubos de centrífuga	

Procedimento

Para cada doseamento será necessário cerca de 200 mL de meio de cultura sem células

1. Próximo à chama do bico de Bunsen, transferir do erlenmeyer para um béquer cerca de 200 mL de meio de cultura.
2. Transferir o meio de cultura para tubos de centrífuga.
3. Centrifugar o material a 1500X *g* por 10 min.
4. Transferir os sobrenadantes para uma proveta de 250 mL.
5. Colocar delicadamente o alcoômetro na proveta.
6. Aguardar o alcoômetro estabilizar.
7. Ler no alcoômetro a concentração de etanol.
8. Utilizando a curva padrão abaixo calcular a concentração de etanol no meio de cultura.

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 1

PRÁTICA 1 - PREPARO DE MEIO DE CULTURA
PRÁTICA 2 - INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA
PRÁTICA 3 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
PRÁTICA 4 - DOSAGEM DE GLICOSE
PRÁTICA 5 - DOSAGEM DE ETANOL

INSTRUÇÕES:

1. **Completar as tabelas.**
2. **Calcular a concentração de células de *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras.**
3. **Construir o gráfico de crescimento celular.**
4. **Calcular as massas de glicose utilizadas na curva padrão de glicose.**
5. **Construir a curva padrão de glicose.**
6. **Calcular a concentração de glicose nas amostras.**
7. **Construir o gráfico da concentração de glicose durante o crescimento celular.**
8. **Construir o gráfico da concentração de etanol durante o crescimento celular.**
9. **Analisar criticamente os gráficos.**
10. **Responder as Questões para Análise dos Resultados.**
11. **Ao final, indicar no Relatório o tempo de incubação necessário para recolher as células para a extração da α-glicosidase.**

Questões para Análise dos Resultados

1. Qual o princípio da determinação da concentração de levedura por espectrofotometria?
2. Qual a forma da curva de crescimento?
3. Que equação se ajustaria à curva de crescimento?
4. Como se explica a forma da curva de crescimento de leveduras?
5. O que é um espectro de absorção no UV-Vis de um composto?
6. Por que algumas substâncias são coloridas?
7. Qual o aspecto de um gráfico de Absorbância versus λ (comprimento de onda)?
8. Podemos usar essa propriedade para detectar e quantificar essas substâncias?
9. O que é a Lei de Lambert-Beer?
10. Quais os desvios da Lei de Lambert-Beer?
11. Por que a absorbância das amostras deve cair dentro dos limites da curva padrão?
12. Como se calcula a concentração de substâncias a partir de uma curva padrão?

TABELA PARA O CÁLCULO DE VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA

frascos	tempos	A_{570} (A)	diluições (B)	A_{570} corrigidas (C)	concentração (D)
	(h)	(unidades de abs)		(unidades de abs)	(mg/mL)
				A x B	C X 0,69
12h-20h	12		3		
	14		10		
	16		20		
	18		20		
	20		20		
18h-26h	18		10		
	20		30		
	22		40		
	24		40		
	26		40		
24h-32h	24		10		
	26		40		
	28		40		
	30		40		
	32		40		

TABELA PARA O CÁLCULO DA CURVA-PADRÃO DE GLICOSE

tubos	massa de glicose (A)	A_{540}	A_{540} ***corrigida*** (B)
	(mg)	(unidades de abs)	(unidades de abs)
			(- branco)
branco			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Coeficientes: y = ax + b	
coeficiente angular = a	
coeficiente linear = b	
coeficiente correlação linear	

Tabela para o cálculo de valores de concentração de glicose no meio de cultura

tempos	A_{540}	A_{540} corrigida	fator	massa	diluições	massa real	volume	concentração
	(unidades de abs)	(unidades de abs)	de correção	(mg)		(massa x dil)	(mL)	(mg/mL)
		(- branco)	**y = ax + b (tabela de curva padrão de glicose)**					
branco								
12					20		0,125	
14					20		0,125	
16					20		0,125	
18					20		0,125	
20					20		0,125	
18					20		0,125	
20					20		0,125	
22					2		0,125	
24					2		0,125	
26					2		0,125	
24					2		0,125	
26					2		0,125	
28					2		0,125	
30					2		0,125	
32					2		0,125	

TABELA PARA O CÁLCULO DE VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO MEIO DE CULTURA

tempos	% etanol (alcoômetro)	fator de correção	concentração (mg/mL)
		y = ax + b (curva padrão de etanol)	
12			
14			
16			
18			
20			
18			
20			
22			
24			
26			
24			
26			
28			
30			
32			

TABELA DAS CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS, GLICOSE E ETANOL AO LONGO DA CURVA DE CRESCIMENTO

tempos	concentração de células (mg/mL)	concentração de glicose (mg/mL)	concentração de etanol (mg/mL)
12			
14			
16			
18			
20			
18			
20			
22			
24			
26			
24			
26			
28			
30			
32			

Planejamento 2

PRÁTICA 6 - FRACIONAMENTO CELULAR
PRÁTICA 7 - DOSAGEM DE PROTEÍNA
Questões para Discussão

1. Definir aminoácido.
2. Definir ligação peptídica.
3. Definir proteína.
4. Há vários métodos para a determinação da concentração de proteínas. Ler o texto a seguir e indicar as vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de dosagem de proteínas.

Métodos de dosagem de proteínas

Absorbância de luz UV – *Gill and von Hippel, Analytical Biochemistry 182, 319 – 326, 1989*
Cadeias laterais de aminoácidos aromáticos absorvem luz em 280nm. Assim, a absorbância de uma proteína dependerá do seu conteúdo de tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp). Para a quantificação de uma proteína sem uso de referências é necessário conhecer sua sequência de aminoácidos. Compostos que absorvem em UV podem interferir na quantificação da proteína. A diferença de conteúdo de aminoácidos aromáticos entre o padrão e a amostra pode introduzir erros na quantificação.
Reação de Biureto
Baseia-se em uma reação em meio muito alcalino entre $CuSO_4$ e grupos amino da ligação peptídica. O produto desta reação (um catíon Cu^{2+} coordenado com 4 grupos amino) absorve em 540nm. A concentração das amostras de proteínas deve ser na ordem de miligramas.
Reagente de Folin – *Peterson, Analytical Biochemistry 100, 201 – 220, 1979*
Baseia-se em uma reação semelhante à Biureto, porém mais sensível. Apresenta um grande número de interferentes. Uma solução contendo Cu^{2+} é inicialmente adicionada à amostra de proteína, ocorrendo a formação de Cu^{+}. Este íon em seguida reduz uma mistura de ácidos tungstênico e fosfomolibdênico, formando tunsgtato e molibibdato, os quais absorvem entre 720 e 750 nm. A quantidade de produto colorido formado é fortemente dependente da quantidade de asparagina (Asn), triptofano (Trp) e histidinas (His) presentes na proteína.
Reagente de Bradford – *Bradford, Analytical Biochemistry 72, 248 – 254, 1976*
O corante forma complexos com proteínas provavelmente por meio de interações iônicas com aminoácidos básicos e também de interações de Van der Waals. A formação do complexo proteína-corante altera o espectro de absorção do corante, mudando seu máximo de absorção de 465nm para 595nm. Lipídios interferem neste método. O corante não liga igualmente em todas as proteínas.
Coloração com Ag^{+} - *Krystal et al, Analytical Biochemistry 148, 451 – 460, 1985*
Baseia-se na capacidade de ligação de proteínas à íons Ag^{+}, formando um complexo que absorve em 420nm. Detecta até nanogramas de proteína, porém sais, grupos tiol e detergentes interferem na reação.
Fluorescamina
Este composto reage com grupos amino presentes na proteína formando um produto fluorescente. Desta forma, trata-se de um método que lê na ordem de pmols, mas qualquer grupo amino presente no meio pode reagir.

Discussão das *Práticas 6* e *7*

5. Na *Prática 6*, para que serve o tampão de lise?
6. O EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) presente no tampão de lise é um quelante de metais. Indicar a função do EDTA no fracionamento celular.
7. Por que é necessário usar meio tamponado?
8. O PMSF (fluoreto de α-toluenosulfonila) é adicionado devido as suas propriedades inibidoras. Por que o PMSF é adicionado?
9. Que estratégias podem ser usadas para romper membranas de células?
10. Que estratégia será usada na *Prática 6* para romper as membranas de *Saccharomyces cerevisiae*?
11. Na *Prática 6*, por que a suspensão de células deve ser centrifugada?
12. Por que o tempo de rotação escolhido foi de 2 min? Faz diferença centrifugar por mais tempo ou mesmo tempo?
13. Por que se usa hipoclorito de sódio para lavar as pérolas de vidro?
14. Após o rompimento das células de levedura o lisado será centrifugado. Que materiais celulares devem estar presentes no precipitado e no sobrenadante?
15. Na *Prática 7*, para que serve o reagente de Bradford?
16. Quais os componentes do reagente de Bradford?
17. Quais as limitações do método de Bradford?
18. Como você selecionaria o comprimento de onda para uma dosagem de proteínas?

19. Qual a porcentagem de luz que chegará a uma fotocélula de um espectrofotômetro quando a absorbância for 1. E quando for 2? E quando for 3? O que pode-se inferir dessas respostas.

PRÁTICA 8 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA
Questões para Discussão

20. Qual a diferença entre uma proteína e um enzima?
21. Como se dosa uma enzima?
22. Em que a dosagem de uma enzima difere da dosagem de uma substância qualquer?
23. Definir velocidade inicial (v_0) de uma reação enzimática.
24. Como ter certeza que um ensaio está na velocidade inicial?
25. Como determinar a atividade enzimática (U) de uma enzima?
26. O que é atividade específica? Como se calcula a atividade específica?

Discussão da *Prática 8*

27. Qual o substrato utilizado nesta prática?
28. Qual a reação catalisada pela enzima a partir deste substrato?
29. Qual(is) o(s) produto(s) da reação catalisada pela enzima a partir deste substrato?
30. Qual dos materiais empregados na determinação da atividade enzimática (Tabela 1) contém as enzimas?
31. Quais os tubos controle? Qual a função de cada tubo controle?
32. Por que os tubos devem ser mantidos em banho de gelo?
33. Por que os tubos devem ser transferidos ao mesmo tempo para o banho a 30°C?
34. Qual a função do tampão carbonato-bicarbonato ao ser adicionado no final da incubação?
35. Por que a leitura da absorbância é feita a 420 nm?
36. Por que é necessário preparar vários tubos com os mesmos conteúdos de enzima e substrato e variar o tempo de incubação?
37. Quais as alternativas para este procedimento?

Prática 6
Fracionamento Celular

Objetivos
Fracionar células de *Saccharomyces cerevisiae.*

Reagentes	Materiais	Aparelhagens
água destilada	banho de gelo	centrífuga
células de levedura (fase log tardia)	pérolas de vidro 0,5 mm ∅	estufa
etanol	pipetadores	*freezer*
fluoreto de α-toluenosulfonila (PMSF) 100 mM em etanol	pipetas	vórtice
hipoclorito de sódio 20 g/L (água sanitária)	provetas	
tampão fosfato 100 mM pH 7,0 com EDTA 5 mM (tampão de lise)	suporte para tubos	
	tubos de centrífuga	
	tubos de ensaio	
	tubos Falcon	

Procedimento A – preparo do meio, cultivo e separação das células

Preparo do meio
1. Preparar 150 mL de meio de cultura para a cepa S14 de *S. cerevisiae.*
2. Seguir procedimento da *Prática 1 – Preparo de Meio de Cultura* com as seguintes alterações:
   a. meio de cultura: extrato de levedura 20 g/L, peptona 20 g/L, maltose 50 g/L, pH 5,2;

Cultivo
3. Cultivar as células de maneira semelhante à *Prática 2 – Inoculação no Meio de Cultura.*

Separação de células
4. Separar as células quando atingir o tempo necessário à síntese de α-glicosidase.
5. Remover da suspensão de células um volume que contenha 1 g de células (peso úmido).
6. Colocar o meio contendo as células em tubo de centrífuga.
7. Centrifugar o meio a 1500X *g* por 10 min.
8. Descartar o sobrenadante.
9. Ressuspender o precipitado em água destilada gelada para um volume final de 20 mL.
10. Centrifugar o meio novamente a 1500X *g* por 10 min.
11. Descartar o sobrenadante.
12. Repetir as etapas 9 a 11 mais uma vez.

Procedimento B – Fracionamento celular

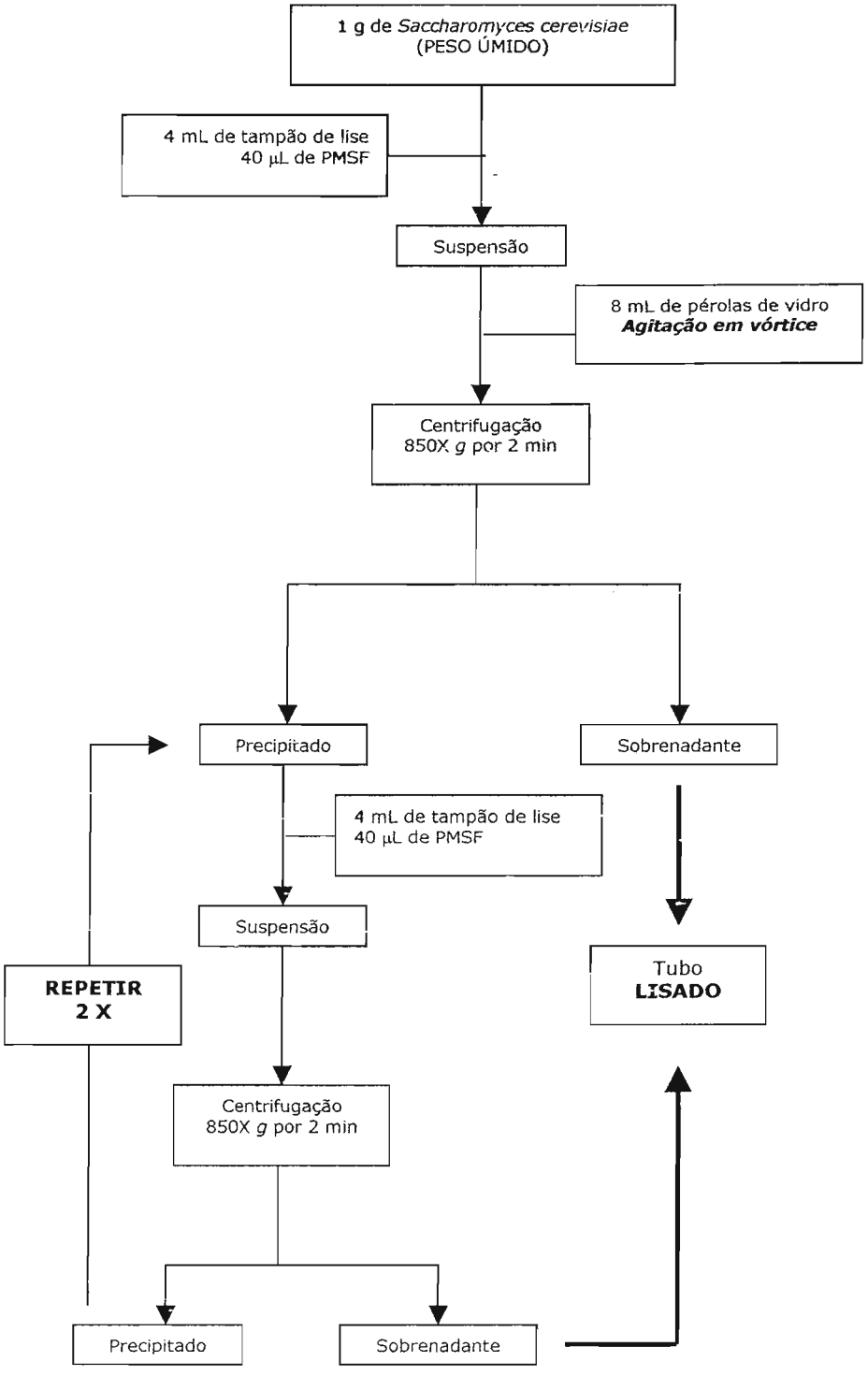
OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Em um tubo de centrífuga com tampa colocar aproximadamente 1 g (peso úmido) de células de leveduras crescidas até a fase logarítmica tardia.
2. Adicionar 4 mL de tampão de lise.
3. Ressuspender as células usando um vórtice.
4. Adicionar 40 µL de PMSF 100 mM em etanol.
5. Homogeneizar em vórtice.
6. Adicionar à suspensão 8 mL de pérolas de vidro lavadas e secas.
7. Agitar ***ininterruptamente*** em vórtice durante 1 min (***processo de lise***).
8. Resfriar em banho de gelo por 1 min (***processo de lise***).
9. Repetir as operações 7 e 8 por mais 4 vezes.
10. Centrifugar a suspensão de células + pérolas de vidro a 850x *g* por 2 min.
11. Remover cuidadosamente o sobrenadante – ***evitar coletar o material precipitado*** – para um tubo Falcon limpo e identificado como **LISADO**.
12. Manter tubo LISADO em banho de gelo.
13. Ressuspender o precipitado + pérolas de vidro em 4 mL de tampão de lise.
14. Adicionar 40 µL de PMSF 0,1 M em etanol.
15. Homogeneizar em vórtice.
16. Repetir as etapas 10 a 15 por mais 2 vezes, reunindo os sobrenadantes no mesmo tubo LISADO.
17. Usando uma proveta, determinar o volume do LISADO.
18. ***Identificar o tubo com o nome do grupo***.
19. Armazenar em freezer a -20°C.

Procedimento C – Lavagem das pérolas de vidro

1. Transferir as pérolas de vidro para um erlenmeyer.
2. Adicionar hipoclorito de sódio no erlenmeyer.
3. Agitar algumas vezes durante 15 min.
4. Descartar cuidadosamente o hipoclorito de sódio
5. Repetir a lavagem com hipoclorito de sódio.
6. Adicionar água no erlenmeyer
7. Lavar as pérolas.
8. Descartar cuidadosamente a água.
9. Repetir as etapas 6 a 8 por mais 5 vezes.
10. Adicionar etanol no erlenmeyer.
11. Colocar o erlenmeyer numa estufa.
12. Aguardar a secagem das pérolas.

FLUXOGRAMA



Prática 7
Dosagem de Proteína

Objetivos
Dosar colorimetricamente proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes
água destilada
albumina 0,2 g/L
lisado de leveduras (***P6***)
reagente de Bradford
- ácido fosfórico 85%
- Coomassie Blue G®
- metanol

Materiais
papel de filtro
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiras
suportes para tubos de ensaio
tubos de ensaio

Aparelhagens
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Curva padrão de proteína

1. Adicionar em cada tubo os volumes de albumina e água estipulados na **Tabela 1**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
5. Ler as absorbâncias a 595 nm.
6. Completar a **Tabela 2**.
7. Construir a curva padrão de proteína.

Tabela 1

tubos	albumina 0,2 g/L (µL)	água (µL)	reagente de Bradford (mL)
branco	0	100	1,0
1	10	90	1,0
2	20	80	1,0
3	30	70	1,0
4	40	60	1,0
5	50	50	1,0
6	60	40	1,0
7	70	30	1,0
8	80	20	1,0

Tabela 2

tubos	massa de proteína (mg)	A_{595}	A_{595} ***corrigido***
branco			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Procedimento B – Dosagem de proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

OBSERVAÇÃO: para esse procedimento é necessário que o lisado seja diluído. Para isso segue o procedimento para diluição.

Diluição 200X:

1. Transferir 0,1 mL do lisado para um tubo de ensaio grande identificado como **L200X**.
2. Adicionar 19,9 mL de água destilada.
3. Homogeneizar em vórtice.

1. Adicionar em cada tubo os volumes de água e amostras do lisado (devidamente diluído) estipulados na **Tabela 3**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
5. Ler as absorbâncias a 595 nm.
6. Completar a **Tabela 4**.

OBSERVAÇÃO: Caso a absorbância das amostras seja maior que a absorbância máxima obtida na curva padrão, dilua novamente o lisado. Discuta com o professor o novo valor de diluição.

Tabela 3

tubos	L200X (µL)	H_2O (µL)	reagente de Bradford (mL)
branco	-	100	1,0
A1	100	-	1,0
A2	50	50	1,0
A3	30	70	1,0
A4	20	80	1,0

Tabela 4

tubos	A_{595}	A_{595} ***corrigida***
branco		
A1		
A2		
A3		
A4		

Prática 8
Determinação da Atividade Enzimática

Objetivo
Determinar a atividade da α-glicosidase no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

Reagentes
água destilada
lisado de leveduras (***P6***)
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 4 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11,0

Materiais
banho de gelo
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiras
suportes para tubos de ensaio
tubos de ensaio

Aparelhagens
banho a 30°C
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Abaixo segue o procedimento ***sugerido*** para a diluição da preparação do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*. Caso quaisquer das absorbâncias finais seja maior que 1, utilizar outra diluição. Discutir com o professor para a escolha de uma nova diluição adequada para os ensaios.

1. Transferir 0,1 mL do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* para um tubo identificado com **L10X**.
2. Adicionar 0,9 mL de água destilada gelada.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Transferir 0,1 mL de L10X para um novo tubo identificado com **L600X**.
5. Adicionar 5,9 mL de água destilada gelada.
6. Homogeneizar em vórtice.

Procedimento B - Determinação da atividade da α-glicosidase

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. **Preparar os tubos em banho de gelo.**
2. Adicionar em cada tubo os volumes de NPαGlc e água estipulados na **Tabela 1**.
3. Adicionar o lisado (devidamente diluído).
4. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para banho a 30°C.
5. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 1**.
6. Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionado 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
7. Homogeneizar em vórtice.
8. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
9. Usar a água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
10. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, ler as absorbâncias a 420 nm.
11. Completar a **Tabela 2**.
12. Calcular a atividade da α-glicosidase no lisado de *S. cerevisiae*.

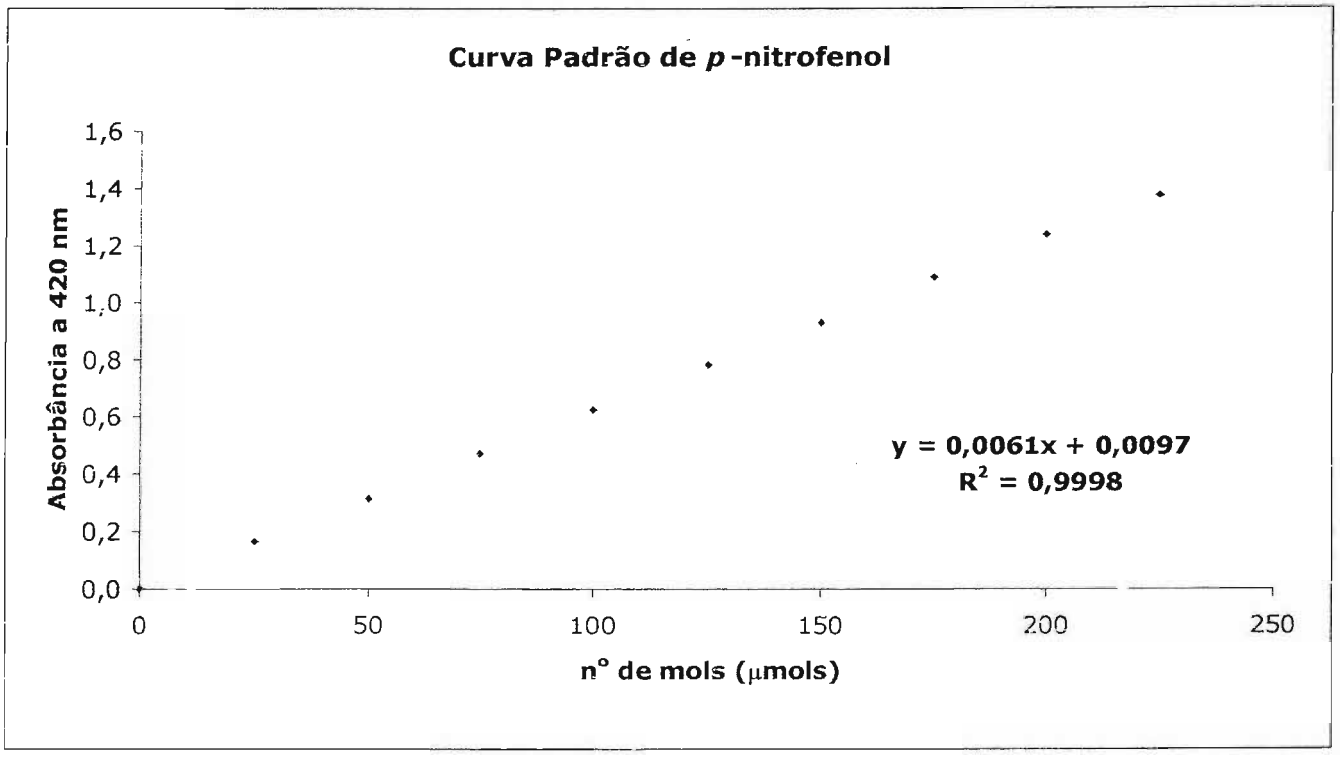
OBSERVAÇÃO: Caso a absorbância lida seja maior do que a absorbância máxima da curva padrão de *p*-nitrofenil-α-glicosídeo, repetir as dosagens com uma diluição maior do lisado.

Tabela 1

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	água (mL)	lisado diluído (mL)	tempo (min)
1	0,2	-	0,2	5
2	0,2	-	0,2	10
3	0,2	-	0,2	15
4	0,2	-	0,2	20
5	0,2	-	0,2	40
branco de ***substrato***	0,2	0,2	-	40
branco de ***enzima***	-	0,2	0,2	40

Tabela 2

tubos	A_{420}	A_{420} ***corrigida***
1		
2		
3		
4		
5		
branco de ***substrato***		
branco de ***enzima***		



Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 2

PRÁTICA 6 - FRACIONAMENTO CELULAR
PRÁTICA 7 - DOSAGEM DE PROTEÍNA
PRÁTICA 8 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

INSTRUÇÕES:

1. **Completar as tabelas.**
2. **Calcular as massas de proteína utilizadas na curva padrão de proteína.**
3. **Construir a curva padrão de proteínas.**
4. **Calcular a concentração de proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.**
5. **Construir a curva de atividade da α-glicosidase.**
6. **Ao final, indicar no Relatório os valores da Atividade Enzimática (Prática 7); Atividade Total (Prática 6 e 7) e Atividade específica (Práticas 7 e 8)**

Questões para Análise dos Resultados

1. Sabendo que a absortividade molar do *p*-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) é de 16800 $M^{-1}.cm^{-1}$ em valores de pH maiores que 9 e de menor que 700 $M^{-1}cm^{-1}$ em valores de pH menores que 4, qual a ***outra*** função do tampão bicarbonato?
2. Lembrando a Lei de Lambert-Beer, como se calcularia a quantidade de produto formado. Para este cálculo o que é preciso: o valor da absortividade, uma solução padrão de *p*-nitrofenil-α-glicosídeo ou ambos?

TABELA PARA O CÁLCULO DA CURVA-PADRÃO DE PROTEÍNA

tubos	massa de proteína (A)	A_{595}	A_{595} corrigida (B)
	(mg)	(unidades de abs)	(unidades de abs)
			(- branco)
branco			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Coeficientes: y = ax + b	
coeficiente angular = a	
coeficiente linear = b	
coeficiente correlação linear	

TABELA PARA O CÁLCULO DE VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO LISADO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

tubos	A_{595}	A_{595} corrigida	fator de correção	massa	volume	concentração	diluições	concentração real
	(unidades de abs)	(unidades de abs)		(mg)	(mL)	(mg/mL)		(conc. x dil)
		(- branco)						(mg/mL)
branco								
A1					0,10		100	
A2					0,05		100	
A3					0,03		100	
A4					0,02		100	

curva padrão de proteínas

TABELA PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

tubos	A_{420} (unidades de abs)	A_{420} corrigida (unidades de abs) *(- brancos)*	fator de correção	nº de mols (nmol)	tempo
branco de substrato			**y = ax + b (tabela de curva padrão de p-nitrofenolato)**		
branco de enzima					
1					5
2					10
3					15
4					20
5					40

Coeficientes: y = ax + b	
coeficiente angular = a	
coeficiente linear = b	
coeficiente correlação linear	

Inclinação da Reta = Atividade Enzimática (em *mU* = *nmol/min*)
Dado que 1 U (unidade) = 1μmol de produto/min

ATIVIDADE (**LISADO DILUÍDO**) = _____ mU (nmol/min)
ATIVIDADE/mL (**LISADO DILUÍDO**) = _____ mU
DILUIÇÃO DO LISADO = _____ X
VOLUME TOTAL DO LISADO (*Prática 6*) = _____ mL
ATIVIDADE/mL (**LISADO**) = _____ mU
ATIVIDADE TOTAL DO LISADO = _____ mU

Planejamento 3

PRÁTICA 9 - CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA – K_M E V_{MAX}
PRÁTICA 10 - CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA – DETERMINAÇÃO DO K_I
PRÁTICA 11 - PREPARO DE TAMPÕES
PRÁTICA 12 - CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA – pH ÓTIMO
Questões para Discussão

1. Esboçar curva de *velocidade inicial* versus *concentração de substrato* (v_o *versus* [S]) para reações catalisadas enzimaticamente.
2. Como V_{max} e K_m podem ser calculados a partir desta curva?
3. Definir K_m e V_{max}.
4. O que os valores de K_m e V_{max} indicam?
5. O que é k_{cat}?
6. Por que se considera que V_{max} é uma constante cinética de uma enzima se ela depende da concentração de enzima no ensaio?
7. Porque se recomenda que seja utilizada a v_0 para se preparar a curva de velocidade versus concentração de substrato (v_0 x [S])?
8. Sabe-se que para [E] = x tem-se V_{max} = 1 U, o que ocorrerá com V_{max} se [E] = 2x? Qual será o valor de K_m?
9. O que é transformação de Lineweaver-Burk?
10. Esboçar curvas de *velocidade inicial* versus *concentração de substrato* (v_o *versus* [S]) para reações catalisadas enzimaticamente:
    a. na ausência de inibidor:
    b. na presença de inibidor competitivo:
    c. na presença de inibidor não-competitivo.
11. Esboce curvas de Lineweaver-Burk para reações catalisadas enzimaticamente:
    a. na ausência de inibidor:
    b. na presença de inibidor competitivo:
    c. na presença de inibidor não-competitivo.
12. Definir K_i.
13. O que o valor de K_i indica?
14. Como se determina o K_i graficamente?
15. Qual a função de um tampão?
16. O que é pK_a?
17. Um estudante deve preparar um tampão fosfato pH 7,0 200mM. Para isso dispões da seguinte *receita*:

Adicionar num béquer os seguintes volumes:
a. 10,5 mL de solução de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 200 mM;
b. 90,5 mL de solução de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 200 mM.

    O que fazer quando só há uma dessas soluções em estoque?
18. Descreva de maneira sucinta as diferentes formas de preparar um tampão fosfato 100 mM pH 7,0, dispondo de fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, HCl e NaOH?

Discussão das *Práticas 9, 10, 11 e 12*

19. A maltose se liga em qual região da enzima?
20. A maltose é um inibidor típico?
21. Que procedimentos experimentais são necessários para a determinação de V_{max} e K_m?
22. Leia as *Práticas 9* e *10* e indique a faixa de concentração de substrato que será usada?
23. Na *Prática 10*, identificar as concentrações de inibidor que serão usadas.
24. É possível determinar graficamente o K_i utilizando os resultados dos outros grupos?
25. Como saber que a enzima é estável em todos os valores de pH utilizados? Propor um experimento para verificar em quais valores ela é estável.
26. Por que deve-se fazer um conjunto de tubos para cada pH?
27. Por que nesta prática o substrato será dissolvido em água?

Prática 9
Caracterização da enzima: K_m e V_{max}

Objetivos
Caracterizar a α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* através das determinações da afinidade (K_m) da enzima pelo substrato (*p*-nitrofenol-α-glicosídeo) e da velocidade máxima (V_{max}) de hidrólise do substrato.

Reagentes
água destilada
lisado de levedura (***P6***)
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 1,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 2,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 8,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11,0
tampão fosfato 100 mM pH 7,0

Materiais
banho de gelo
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiras
suporte para tubos de ensaio
tubos de ensaio

Aparelhagens
banho 30°C
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Abaixo segue o procedimento ***sugerido*** para a diluição da preparação do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*. Caso quaisquer das absorbâncias finais seja maior que 1, utilizar outra diluição. Discutir com o professor para a escolha de uma nova diluição adequada para os ensaios.

1. Transferir 0,1 mL do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* para um tubo identificado com **L10X**.
2. Adicionar 0,9 mL de água destilada gelada.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Transferir 0,1 mL de L10X para um novo tubo identificado com **L600X**.
5. Adicionar 5,9 mL de água destilada gelada.
6. Homogeneizar em vórtice.

Procedimento B – Medidas de velocidade de reação

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar em cada tubo os volumes de NPαGlc estipulados na **Tabela 1**.
   ATENÇÃO: prestar atenção nas diferentes concentrações pedidas de substrato.
2. Adicionar em cada tubo os volume de tampão e lisado (devidamente diluído) estipulados na **Tabela 1**.
3. **Preparar os tubos em banho de gelo.**
4. Homogeneizar em vórtice.
5. Transferir todos os tubos do gelo para o banho a 30°C.
6. Incubar todos os tubos por 40 min.
7. Remover todos os tubos do banho.
8. Adicionar 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato.
9. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
10. Homogeneizar em vórtice.
11. Usar a água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
12. Ler as absorbâncias a 420 nm.
13. Completar a **Tabela 2**.
14. Construir os gráficos necessários para a caracterização de K_m e V_{max} da α-glicosidase.

OBSERVAÇÃO: Caso as velocidades das reações sejam muito altas é necessária a diluição do lisado (enzima). Discutir com o professor sobre a nova diluição.

Tabela 1

tubos	NPαGlc 1,0 mM (mL)	NPαGlc 2,0 mM (mL)	NPαGlc 8,0 mM (mL)	tampão fosfato 100 mM pH 7 (mL)	**lisado diluído** (mL)
1	0,02	-	-	0,28	0,10
2	0,04	-	-	0,26	0,10
3	0,08	-	-	0,22	0,10
4	0,12	-	-	0,18	0,10
5	0,16	-	-	0,14	0,10
6	0,20	-	-	0,10	0,10
7	-	0,16	-	0,14	0,10
8	-	0,20	-	0,10	0,10
9	-	-	0,10	0,20	0,10
10	-	-	0,13	0,17	0,10
11	-	-	0,15	0,15	0,10

Tabela 2

tubos	[S] ensaio (mM)	A_{420}
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Prática 10
Caracterização da enzima – determinação do K_i

Objetivos
Determinar a constante de um inibidor (maltose) sobre a hidrólise de *p*-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) pela α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes
água destilada
lisado de levedura (*P6*)
maltose 0,4 M em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
maltose 1,2 M em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
maltose 1,6 M em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 1,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 2,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 8,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11,0
tampão fosfato 100 mM pH 7,0

Materiais
banho de gelo
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiras
suporte para tubos
tubos de ensaio

Aparelhagens
banho 30°C
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

Atenção: Será utilizada a mesma solução de enzima já diluída para a *Prática 9 – Caracterização da enzima: K_m e V_{max}*. Não há necessidade de preparar uma nova diluição.

Procedimento B – Medidas da velocidade de reação na presença de inibidor

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar em cada tubo os volumes de NPαGlc e maltose estipulados na **Tabela 1**.
   ATENÇÃO: prestar atenção nas diferentes concentrações pedidas de substrato e inibidor.
2. Adicionar em cada tubo os volume de tampão e lisado (devidamente diluído) estipulados na **Tabela 1**.
3. **Preparar os tubos em banho de gelo**.
4. Homogeneizar em vórtice.
5. Transferir todos os tubos do gelo para o banho a 30°C.
6. Incubar todos os tubos por 40 min.
7. Remover todos os tubos do banho.
8. Adicionar 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato.
9. **Deixar os tubos em temperatura ambiente**.
10. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
11. Ler as absorbâncias a 420 nm.
12. Completar a **Tabela 2**.
13. Construir os gráficos necessários para a determinação do K_i da maltose para a α-glicosidase.

Tabela 1

tubos	NPαGlc 1,0 mM (mL)	NPαGlc 2,0 mM (mL)	NPαGlc 8,0 mM (mL)	maltose 0,4 M (mL)	maltose 1,2 M (mL)	maltose 1,6 M (mL)	tampão fosfato 100 mM pH 7 (mL)	lisado diluído (mL)
1 A	0,08	-	-	0,10	-	-	0,12	0,10
1 B	0,08	-	-	0,10	-	-	0,12	0,10
2 A	0,20	-	-	0,10	-	-	-	0,10
2 B	0,20	-	-	0,10	-	-	-	0,10
3 A	-	0,16	-	0,10	-	-	0,04	0,10
3 B	-	0,16	-	0,10	-	-	0,04	0,10
4 A	-	0,20	-	0,10	-	-	-	0,10
4 B	-	0,20	-	0,10	-	-	-	0,10
5 A	-	-	0,10	0,10	-	-	0,10	0,10
5 B	-	-	0,10	0,10	-	-	0,10	0,10
6 A	-	-	0,15	0,10	-	-	0,05	0,10
6 B	-	-	0,15	0,10	-	-	0,05	0,10
7 A	0,08	-	-	-	0,10	-	0,12	0,10
7 B	0,08	-	-	-	0,10	-	0,12	0,10
8 A	0,20	-	-	-	0,10	-	-	0,10
8 B	0,20	-	-	-	0,10	-	-	0,10
9 A	-	0,16	-	-	0,10	-	0,04	0,10
9 B	-	0,16	-	-	0,10	-	0,04	0,10
10 A	-	0,20	-	-	0,10	-	-	0,10
10 B	-	0,20	-	-	0,10	-	-	0,10
11 A	-	-	0,10	-	0,10	-	0,10	0,10
11 B	-	-	0,10	-	0,10	-	0,10	0,10
12 A	-	-	0,15	-	0,10	-	0,05	0,10
12 B	-	-	0,15	-	0,10	-	0,05	0,10
13 A	0,08	-	-	-	-	0,10	0,12	0,10
13 B	0,08	-	-	-	-	0,10	0,12	0,10
14 A	0,20	-	-	-	-	0,10	-	0,10
14 B	0,20	-	-	-	-	0,10	-	0,10
15 A	-	0,16	-	-	-	0,10	0,04	0,10
15 B	-	0,16	-	-	-	0,10	0,04	0,10
16 A	-	0,20	-	-	-	0,10	-	0,10
16 B	-	0,20	-	-	-	0,10	-	0,10
17 A	-	-	0,10	-	-	0,10	0,10	0,10
17 B	-	-	0,10	-	-	0,10	0,10	0,10
18 A	-	-	0,15	-	-	0,10	0,05	0,10
18 B	-	-	0,15	-	-	0,10	0,05	0,10

Tabela 2

tubos	[S] final (mM)	[I] final (M)	A_{420}
1 A			
1 B			
2 A			
2 B			
3 A			
3 B			
4 A			
4 B			
5 A			
5 B			
6 A			
6 B			

tubos	[S] final (mM)	[I] final (M)	A_{420}
7 A			
7 B			
8 A			
8 B			
9 A			
9 B			
10 A			
10 B			
11 A			
11 B			
12 A			
12 B			

tubos	[S] final (mM)	[I] final (M)	A_{420}
13 A			
13 B			
14 A			
14 B			
15 A			
15 B			
16 A			
16 B			
17 A			
17 B			
18 A			
18 B			

Prática 11
Preparo de Tampões

Objetivos
Preparar seis tampões com diferentes valores de pH.

Reagentes	Materiais	Aparelhagens
ácido bórico	bastões de vidro	balança
ácido cítrico	béqueres	pHmetro
ácido clorídrico	pipetas Pasteur	
água destilada	provetas	
fosfato de sódio dibásico		
hidróxido de sódio		

Procedimentos

pH 4,0	pH 7,0
tampão citrato 200 mM pH 4,0 1. Preparar 50 mL de tampão. 2. Pesar a massa necessária de ácido cítrico para que, ao final do procedimento, a concentração seja de 200 mM. 3. Adicionar a massa pesada em um béquer. 4. Dissolver essa massa em 40 mL de água destilada. 5. Medir o pH da solução resultante. 6. Acertar para o pH desejado com HCl ou NaOH. 7. Transferir o volume para uma proveta. 8. Completar o volume para 50 mL de tampão.	**tampão fosfato 200 mM pH 7,0** 1. Preparar 50 mL de tampão. 2. Pesar a massa necessária de fosfato de sódio dibásico para que, ao final do procedimento, a concentração seja de 200 mM. 3. Adicionar a massa pesada em um béquer. 4. Dissolver essa massa em 40 mL de água destilada. 5. Medir o pH da solução resultante. 6. Acertar para o pH desejado com HCl ou NaOH. 7. Transferir o volume para uma proveta. 8. Completar o volume para 50 mL de tampão.
pH 5,0	**pH 8,0**
tampão citrato 200 mM pH 5,0 1. Preparar 50 mL de tampão. 2. Pesar a massa necessária de ácido cítrico para que, ao final do procedimento, a concentração seja de 200 mM. 3. Adicionar a massa pesada em um béquer. 4. Dissolver essa massa em 40 mL de água destilada. 5. Medir o pH da solução resultante. 6. Acertar para o pH desejado com HCl ou NaOH. 7. Transferir o volume para uma proveta. 8. Completar o volume para 50 mL de tampão.	**tampão borato 200 mM pH 8,0** 1. Preparar 50 mL de tampão. 2. Pesar a massa necessária de ácido bórico para que, ao final do procedimento, a concentração seja de 200 mM. 3. Adicionar a massa pesada em um béquer. 4. Dissolver essa massa em 40 mL de água destilada. 5. Medir o pH da solução resultante 6. Acertar para o pH desejado com HCl ou NaOH. 7. Transferir o volume para uma proveta. 8. Completar o volume para 50 mL de tampão.
pH 6,0	**pH 9,0**
tampão citrato 200 mM pH 6,0 1. Preparar 50 mL de tampão. 2. Pesar a massa necessária de ácido cítrico para que, ao final do procedimento, a concentração seja de 200 mM. 3. Adicionar a massa pesada em um béquer. 4. Dissolver essa massa em 40 mL de água destilada. 5. Medir o pH da solução resultante. 6. Acertar para o pH desejado com HCl ou NaOH. 7. Transferir o volume para uma proveta. 8. Completar o volume para 50 mL de tampão.	**tampão borato 200 mM pH 9,0** 1. Preparar 50 mL de tampão. 2. Pesar a massa necessária de ácido bórico para que, ao final do procedimento, a concentração seja de 200 mM. 3. Adicionar a massa pesada em um béquer. 4. Dissolver essa massa em 40 mL de água destilada. 5. Medir o pH da solução resultante. 6. Acertar para o pH desejado com HCl ou NaOH. 7. Transferir o volume para uma proveta. 8. Completar o volume para 50 mL de tampão.

Fórmulas Estruturais e Massas Molares:

ácido cítrico:	$HO\text{-}C(COOH)_2\text{-}COOH$	192,13 g/mol
fosfato de sódio dibásico (anidro):	Na_2HPO_4	141,96 g/mol
ácido bórico:	H_3BO_3	61,83 g/mol

Constantes de dissociação (K) a 25 °C:

	$pK_1 = 3,14$		$pK_1 = 2,12$		$pK_1 = 9,14$
ácido cítrico	$pK_2 = 5,95$	ácido fosfórico	$pK_2 = 7,21$	ácido bórico	$pK_2 = 12,74$
	$pK_3 = 6,39$		$pK_3 = 12,67$		$pK_3 = 13,80$

Prática 12
Caracterização da enzima – pH ótimo

Objetivo
Determinar o efeito do pH na atividade catalítica da α-glicosidase.

Reagentes
lisado de levedura (***P6***)
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 8 mM **em água**
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11,0
tampão fosfato 200 mM pH 7,0
tampão borato 200 mM pH 8,0
tampão borato 200 mM pH 9,0
tampão citrato 200 mM pH 4,0
tampão citrato 200 mM pH 5,0
tampão citrato 200 mM pH 6,0

Materiais
banho de gelo
pipetadores
pipetas
ponteiras
suporte para tubos
tubos de ensaio

Aparelhagens
banho 30°C
espectrofotômetro

Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

Atenção: Será utilizada a mesma solução de enzima já diluída para a *Prática 9 – Caracterização da enzima:* K_m *e* V_{max}. Não há necessidade de preparar uma nova diluição.

Procedimento B –Ensaio da atividade enzimática

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Realizar os ensaios de atividade enzimática sobre *p*-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) em 6 diferentes valores de pH.
2. Preparar em banho de gelo, para cada pH, um conjunto de tubos para os ensaios de atividade de acordo com as **Tabelas 1** e **3**.
3. Adicionar cuidadosamente no fundo do tubo, sem deixar a amostra escorrer pela parede, os volumes de substrato e tampão estipulados nas **Tabelas 1** e **3**.
4. Misturar cuidadosamente.
5. Adicionar o lisado (devidamente diluído) de *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Agitar delicadamente, **sem espumar**.
7. Transferir todos os tubos do gelo ao mesmo tempo para um banho a 30°C.
8. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados nas **Tabelas 1** e **3**.
9. Ao retirar cada tubo do banho, interromper a reação enzimática pela adição de 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato.
10. **Deixar os tubos em temperatura ambiente**.
11. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
12. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, ler as absorbâncias a 420 nm.
13. Completar as **Tabelas 2** e **4**.
14. Determinar graficamente o pH ótimo da α-glicosidase

OBSERVAÇÃO: Cada sub-grupo deverá trabalhar somente com dois tampões. Assinalar acima de cada tabela o valor de pH utilizado. Na tabela, escrever no quadro correspondente ao tampão utilizado qual o tampão (citrato, borato ou fosfato) e seu respectivo valor de pH.

pH = _____

Tabela 1

tubos	NPαGlc 8 mM (mL)	tampão _____ pH ____ (mL)	lisado diluído (mL)	tempo (min)
branco	0,1	0,3	-	-
1	0,1	0,1	0,2	5
2	0,1	0,1	0,2	10
3	0,1	0,1	0,2	15
4	0,1	0,1	0,2	20

Tabela 2

tubos	A_{420}	A_{420} ***corrigida***
branco		
1		
2		
3		
4		

pH = _____

Tabela 3

tubos	NPαGlc 8 mM (mL)	tampão _____ pH ____ (mL)	lisado diluído (mL)	tempo (min)
branco	0,1	0,3	-	-
1	0,1	0,1	0,2	5
2	0,1	0,1	0,2	10
3	0,1	0,1	0,2	15
4	0,1	0,1	0,2	20

Tabela 4

tubos	A_{420}	A_{420} ***corrigida***
branco		
1		
2		
3		
4		

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 3

Prática 7 - Caracterização da enzima – K_m e V_{max}
Prática 8 - Caracterização da enzima – determinação do K_i
Prática 9 - Caracterização da enzima – pH ótimo

INSTRUÇÕES:

1. **Construir as curvas de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para a caracterização da enzima.**
2. **Construir as curvas de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk na presença do inibidor.**
3. **Construir as curvas de atividades da α-glicosidase nos diferentes valores de pH.**
4. **Construir a curva de pH ótimo (atividade *versus* valor de pH).**
5. **Ao final, indicar no Relatório os valores de K_m (Prática 7); V_{max} (Prática 7); K_i da maltose (Prática 8) e o valor de pH ótimo (Prática 9).**

Questões para Análise dos Resultados

1. O valor de pH ótimo determinado experimentalmente é o mesmo no qual a enzima atua na célula?
2. No sítio ativo da enzima há um resíduo de aminoácido ácido cujo valor de pKa = 5,0. A atividade de uma enzima é diretamente proporcional ao seu estado de dissociação. Ela é ativa quando o resíduo de aminoácido está desprotonado. Esboçar uma curva de atividade de uma enzima em função do pH do meio.
3. No sítio ativo da enzima há um resíduo de aminoácido básico cujo valor de pKa = 9,0. A atividade de uma enzima é diretamente proporcional ao seu estado de dissociação. Ela é ativa quando o resíduo de aminoácido está protonado. Esboçar uma curva de atividade de uma enzima em função do pH do meio.
4. No sítio ativo da enzima há dois resíduos de aminoácidos, um ácido e outro básico, cujos valores de pKa são respectivamente 5,0 e 9,0. A atividade de uma enzima é diretamente proporcional ao seus estados de dissociação. Ela é ativa quando o resíduo de aminoácido ácido está desprotonado e o resíduo do aminoácido básico está protonado. Esboçar uma curva de atividade de uma enzima em função do pH do meio.
5. Correlacionar os esboços com a curva de pH ótimo obtida.
6. Por que o valor de pH afeta a atividade da α-glicosidase? Explicar detalhadamente.

TABELA 1 - PARA O CÁLCULO DE K_M E V_{MAX}

tubos	A_{420} (unidades de abs)	fator de correção	nº de mols (nmol)	velocidade (nmol/min)
1		y = ax + b (tabela de curva padrão de p-nitrofenolato)		
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				

TABELA 2 - PARA O CÁLCULO DE K_M E V_{MAX}

GRÁFICO (MICHAELIS-MENTEN)		GRÁFICO (LINEWEAVER-BURK)	
[S] (mM)	velocidade (nmol/min)	1/[S] $(mM)^{-1}$	1/velocidade $(nmol/min)^{-1}$
0,05		20,0	
0,1		10,0	
0,2		5,0	
0,3		3,3	
0,4		2,5	
0,5		2,0	
0,8		1,3	
1		1,0	
2		0,5	
2,6		0,4	
3		0,3	

K_M = _____ mM V_{MAX} = _____ mU (NMOL/MIN)

TABELA 3 - PARA O CÁLCULO DO K_I – [I] = _____ M

tubos	A_{420} (unidades de abs)	fator de correção	nº de mols (nmol)	velocidade (nmol/min)	[S] (mM)
1		y = ax + b (tabela de curva padrão de p-nitrofenolato)			0,2
2					0,5
3					0,8
4					1,0
5					2,0
6					3,0

TABELA 4 – PARA O CÁLCULO DO K_I – [I] = _____ M

GRÁFICO (MICHAELIS-MENTEN)		GRÁFICO (LINEWEAVER-BURK)	
[S] (mM)	velocidade (nmol/min)	1/[S] $(mM)^{-1}$	1/velocidade $(nmol/min)^{-1}$
0,2		5,0	
0,5		2,0	
0,8		1,3	
1		1,0	
2		0,5	
3		0,3	

KM_A = _____ mM

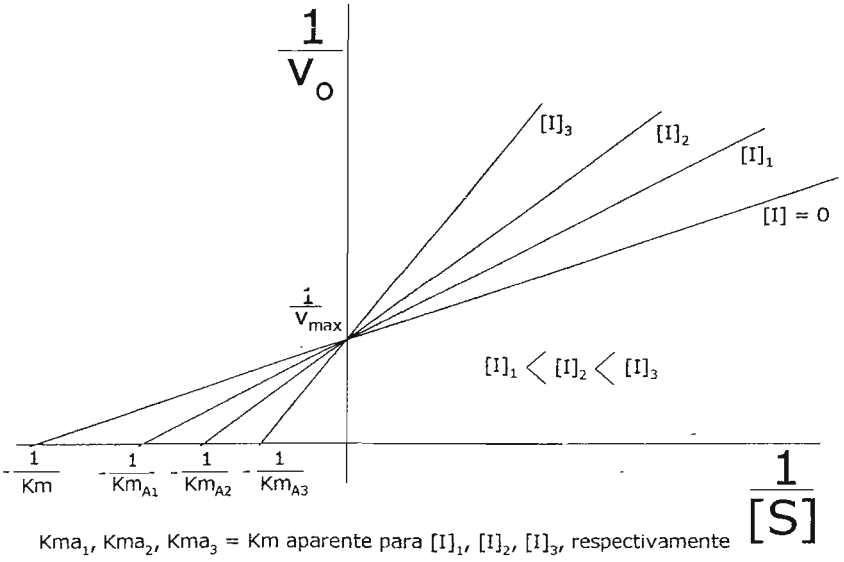
DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA CONSTANTE DE INIBIDOR: K_I

A velocidade máxima da reação depende da quantidade de enzima utilizada. A velocidade máxima é sempre a mesma, qualquer que seja a concentração de inibidor competitivo empregada.

A velocidade da reação $E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$

é dada pela fórmula $V_3 = k_3.[ES]$

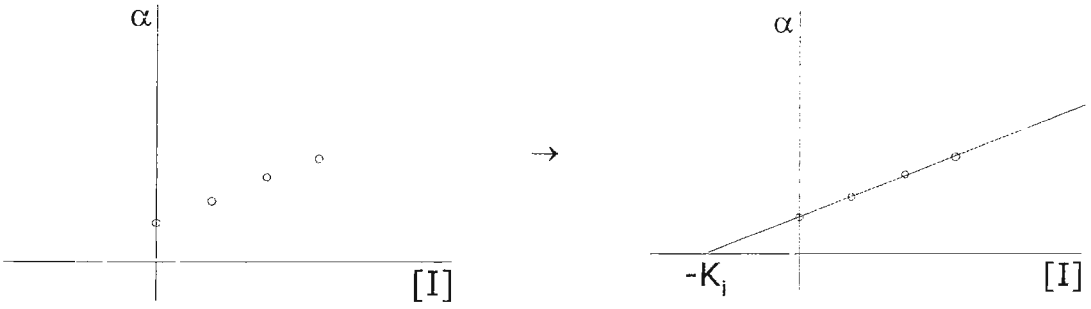
e o gráfico $1/v_o$ *versus* $1/[S]$ para diferentes concentrações de inibidor competitivo é o seguinte:



Para cada concentração de inibidor, há uma relação entre o Km e o Km_A (Km aparente) expressa pela equação

$$Km_A = Km \times \alpha \qquad \text{onde} \qquad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

1. Cada sub-grupo (X1, X2 e X3) deverá fazer seus gráficos de cinética enzimática com inibidor. Do gráfico será encontrado o valor de Km_A;
2. Da razão de Km_A e Km será encontrado o valor de α;
3. Com os dados dos três sub-grupos (X1, X2 e X3) é possível fazer um gráfico que irá relacionar α e [I];
4. Notar que quando o valor de [I] = 0, α = 1. A reta terá que passar, portanto, necessariamente, por 1;
5. Daí deve-se extrapolar os pontos. O ponto no qual a reta cruza o eixo x é o valor numérico negativo de K_i.



CÁLCULO DO pH ÓTIMO

TABELA PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

pH = _____

tubos	A_{420} (unidades de abs)	A_{420} corrigida (unidades de abs) *(- brancos)*	fator de correção	nº de mols (nmol)	tempo
branco de substrato			**y = ax + b (tabela de curva padrão de p-nitrofenolato)**		
branco de enzima					
1					5
2					10
3					15
4					20
5					40

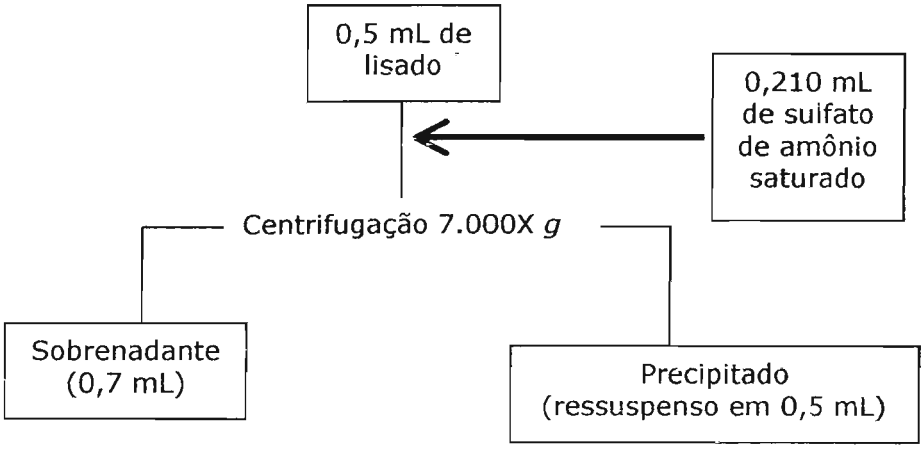
TABELA PARA O CÁLCULO DO VALOR DE pH ÓTIMO

Valor de pH	Atividade Enzimática (mU)
3,0	
4,0	
5,0	
6,0	
7,0	
8,0	
9,0	
10,0	

Planejamento 4

PRÁTICA 13 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS: PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO
Questões para Discussão

1. A bactéria *Escherichia coli* produz abundantemente uma enzima chamada β-galactosidase. Esta enzima hidrolisa dissacarídeos formando monossacarídeos (lactose → galactose + glicose). Um lisado de *E. coli* foi submetido a um tratamento com solução saturada de sulfato de amônio segundo o fluxograma abaixo. Utilizando-se o lisado inicial, o precipitado e o sobrenadante do tratamento foram feitos ensaios de atividade enzimática de β-galactosidase. Os resultados experimentais encontram-se anexados nas tabelas abaixo.
   Baseando-se nos resultados experimentais preencha as tabelas e calcule o enriquecimento e a recuperação da β-galactosidase em cada uma das frações.
   Observações:
   - volume dos ensaios: 0,2 mL;
   - nestes ensaios o substrato utilizado foi o *p*-nitrofenil-β-glicosídeo, cujo produto de hidrólise é o *p*-nitrofenol;
   - o *p*-nitrofenol é detectado espectrofotometricamente utilizando um comprimento de onda de 420 nm;



AMOSTRAS	atividade do lisado diluído (mU)	atividade/mL do lisado diluído (mU/mL)	diluição (X)	ATIVIDADE/mL do lisado (mU/mL)
lisado	2,45	12,26	600	
sobrenadante	1,18	5,88	600	
Precipitado	0,13	0,66	600	

AMOSTRAS	volume total da fração (mL)	ATIVIDADE TOTAL (mU)	concentração de proteína (mg/mL)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (mU/mg)
lisado			19,3	
sobrenadante			6,4	
Precipitado			1,7	

AMOSTRAS	ENRIQUECIMENTO (X)	RECUPERAÇÃO (%)
lisado		
sobrenadante		
Precipitado		

2. Definir enriquecimento enzimático de uma fração.
3. Definir recuperação enzimática em uma fração.

Discussão da *Prática 13*

4. Construir um fluxograma detalhado do processo de purificação da enzima com $(NH4)_2SO_4$.
5. No final da *Prática 13* há uma tabela denominada **nomograma**. Definir nomograma de sulfato de amônio.
6. Use o nomograma para calcular a porcentagem de $(NH_4)_2SO_4$ de cada passo da purificação.
7. Como a determinação da atividade específica de uma enzima durante as várias etapas de uma purificação pode ser relacionada com a purificação da enzima?
8. Que procedimentos devem ser seguidos para se ter certeza da pureza da enzima?

Nomograma

A tabela abaixo apresenta os mililitros (mL) de solução saturada de $(NH_4)_2SO_4$ a serem adicionados a um litro de solução para produzir a variação desejada na porcentagem de saturação. As variações de volume devidas à dissolução (após a mistura) são desprezíveis. O pH de uma solução de sulfato de amônio saturado é aproximadamente 5,5. O pH pode ser ajustado a 7 pela adição de algumas gotas de NH_4OH concentrado.

Concentração final de $(NH_4)_2SO_4$ desejada (% de saturação)	Concentração inicial de $(NH_4)_2SO_4$ na preparação (% de saturação)																	
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
5	52,6																	
10	111	55,8																
15	177	118	58,8															
20	250	188	125	62,5														
25	333	267	200	133	66,7													
30	429	357	286	214	143	71,4												
35	559	462	385	308	231	154	76,9											
40	667	583	500	417	333	250	167	83,3										
45	818	727	637	546	455	364	273	182	91									
50	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100								
55	1222	1111	1000	889	778	667	556	444	333	222	111							
60	1500	1375	1250	1125	1000	875	750	625	500	375	250	125						
65	1857	1714	1571	1429	1286	1143	1000	857	714	571	429	286	143					
70	2333	2167	2001	1833	1667	1500	1333	1167	1000	833	667	500	333	167				
75	3000	2800	2600	2400	2200	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	400	200			
80	4000	3750	3500	3250	3000	2750	2500	2250	2000	1750	1500	1250	1000	750	500	250		
85	5667	5333	5000	4667	4333	4000	3667	3333	3000	2667	2333	2000	1667	1333	1000	667	333	
90	9000	8500	8000	7500	7000	6500	6000	5500	5000	4500	4000	3500	3000	2500	2000	1500	1000	500

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Prática 13
Purificação de proteínas: precipitação com sulfato de amônio

Objetivo
Purificar parcialmente a α-glicosidase por *salting out.*

Reagentes
água destilada
lisado de levedura (P6)
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 4 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
reagente de Bradford
ácido fosfórico 85%
Coomassie Blue G®
metanol
sulfato de amônio saturado pH 7,0
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11,0
tampão fosfato 100 mM pH 7

Materiais
banho de gelo
cubetas para leitura
papel de filtro
pipetadores
pipetas
ponteiras
suporte para tubos
tubos de ensaio
tubos Eppendorf®

Aparelhagens
banho 30°C
centrífuga
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Precipitação com sulfato de amônio

IMPORTANTE: A ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO DEVE SER FEITA LENTA E GRADUALMENTE, SOB AGITAÇÃO CONSTANTE. CASO NÃO SEJA FEITA DESSA FORMA, A PRECIPITAÇÃO NÃO SERÁ SATISFATÓRIA.

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar em um tubo Eppendorf 1 mL de lisado de levedura.
2. Adicionar lentamente 30 μL de solução de sulfato de amônio, mantendo o tubo Eppendorf sob agitação constante.
3. Adicionar lentamente 100 μL de solução de sulfato de amônio, mantendo o tubo Eppendorf sob agitação constante.
4. Repetir o processo mais 3 vezes.

NO TOTAL DEVEM SER ADICIONADOS NO TUBO EPPENDORF 430 μL DE SOLUÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.

5. Manter a solução em temperatura ambiente durante 15 min.
6. Centrifugar a 7000x *g* por 10 min a 4°C.
7. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de ensaio limpo e identificado como ***S1*** (Sobrenadante 1).
8. Remover 0,2 mL de S1 para um tubo Eppendorf identificado como ***S1***. **RESERVAR PARA USO POSTERIOR.**
9. Ressuspender o material precipitado em 1,0 mL de tampão fosfato.
10. Identificar o tubo Eppendorf como ***P1*** (Precipitado 1).
11. Adicionar lentamente ao material do tubo de ensaio S1 100 μL de solução de sulfato de amônio, mantendo o tubo sob agitação constante.
12. Repetir o processo mais 15 vezes.

NO TOTAL DEVEM SER ADICIONADOS NO TUBO DE ENSAIO 1,6 mL DE SOLUÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.

13. Manter o tubo em temperatura ambiente por 15 min.
14. Transferir a solução cuidadosamente para dois tubos Eppendorf.
15. Centrifugar a 7000x *g* por 10 min a 4°C.
16. Transferir os sobrenadantes para dois tubos Eppendorf® limpos e identificados como ***S2*** (Sobrenadante 2).
17. Ressuspender o precipitado em 0,5 mL de tampão fosfato.
18. Identificar o tubo como ***P2*** (Precipitado 2).

DILUIÇÕES PARA OS PROCEDIMENTOS B E C

Diversas diluições do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* e suas frações são necessárias para os procedimentos de dosagem de proteína e determinação da atividade enzimática. Para isso seguem os procedimentos para as diluições requeridas. ***Prestar atenção quais as diluições cada procedimento requer***.

Lisado	
L200X (proteína)	Transferir 50 µL de lisado de levedura para um tubo de ensaio. Adicionar 9950 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como L200X.
L600X (atividade)	Transferir 400 µL de L200X para um tubo de ensaio. Adicionar 800 µL mL de água destilada. Homogeneizar Identificar o tubo de ensaio como L600X.
Fração S1	
S1 100X (proteína)	Transferir 50 µL de S1 para um tubo de ensaio. Adicionar 4950 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como S1 100X.
S1 600X (atividade)	Transferir 200 µL de S1 100X para um tubo de ensaio. Adicionar 1000 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como S1 600X.
Fração P1	
P1 10X (proteína)	Transferir 50 µL de P1 para um tubo de ensaio. Adicionar 450 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como P1 10X.
P1 600X (atividade)	Transferir 50 µL de P1 10X para um tubo de ensaio. Adicionar 2950 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como P1 600X
Fração S2	
S2 10X (proteína)	Transferir 50 µL de S2 para um tubo de ensaio. Adicionar 450 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como S2 10X.
Fração P2	
P2 100X (proteína)	Transferir 50 µL de P2 para um tubo de ensaio. Adicionar 4950 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como P2 100X.
P2 400X (atividade)	Transferir 200 µL de P2 100X para um tubo de ensaio. Adicionar 1000 µL de água destilada. Homogeneizar. Identificar o tubo de ensaio como P2 400X.

Procedimento B – Dosagem de proteína no lisado e nas frações

1. Adicionar em cada tubo os volumes de amostras (devidamente diluídas) e água estipulados na **Tabela 1**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
5. Ler as absorbâncias a 595 nm.
6. Completar a **Tabela 2**.

Tabela 1

tubos	amostras					água (mL)	reagente de Bradford (mL)
	lisado 200X (mL)	S1 100X (mL)	P1 10X (mL)	S2 10X (mL)	P2 100X (mL)		
branco	-	-	-	-	-	0,1	1,0
1 A	0,1	-	-	-	-	-	1,0
1 B	0,1	-	-	-	-	-	1,0
2 A	-	0,1	-	-	-	-	1,0
2 B	-	0,1	-	-	-	-	1,0
3 A	-	-	0,1	-	-	-	1,0
3 B	-	-	0,1	-	-	-	1,0
4 A	-	-	-	0,1	-	-	1,0
4 B	-	-	-	0,1	-	-	1,0
5 A	-	-	-	-	0,1	-	1,0
5 B	-	-	-	-	0,1	-	1,0

Tabela 2

tubos	A_{595}	A_{595} **corrigida**	fator de correção	massa (mg)	volume (mL)	concentração (mg/mL)	diluições	concentração real (mg/mL)
branco		-	**curva padrão de proteínas**	-	-	-	-	-
1 A								
1 B								
2 A								
2 B								
3 A								
3 B								
4 A								
4 B								
5 A								
5 B								

Procedimento C – Determinação das atividades enzimáticas

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Preparar um conjunto de tubos de ensaio para as determinações das atividades enzimáticas de acordo com as **Tabelas 3, 4, 5, 6** e **7**.
2. Adicionar em cada tubo os volumes de NPαGlc e água estipulados nas **Tabelas 3, 4, 5, 6** e **7**.
3. Adicionar o lisado e as frações (devidamente diluídos). **Preparar os tubos dentro do banho de gelo**.
4. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho a 30°C.
5. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados nas **Tabelas 3, 4, 5, 6** e **7**.
6. Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato.
7. **Deixar os tubos em temperatura ambiente**.
8. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
9. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, ler as absorbâncias a 420 nm.
10. Completar as **Tabelas 3, 4, 5, 6** e **7**.
11. Calcular a atividade enzimática da α-glicosidase do lisado e suas frações.

Tabela 3

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	**lisado L600X** (mL)	tempo (min)	A_{420}
1	0,2	0,2	5	
2	0,2	0,2	10	
3	0,2	0,2	15	
4	0,2	0,2	20	

Tabela 4

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	**fração S1 600X** (mL)	tempo (min)	A_{420}
5	0,2	0,2	5	
6	0,2	0,2	10	
7	0,2	0,2	15	
8	0,2	0,2	20	

Tabela 5

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	**fração P1 600X** (mL)	tempo (min)	A_{420}
9	0,2	0,2	5	
10	0,2	0,2	10	
11	0,2	0,2	15	
12	0,2	0,2	20	

Tabela 6

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	**fração S2** (mL)	tempo (min)	A_{420}
13	0,2	0,2	5	
14	0,2	0,2	10	
15	0,2	0,2	15	
16	0,2	0,2	20	

Tabela 7

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	**fração P2 400X** (mL)	tempo (min)	A_{420}
17	0,2	0,2	5	
18	0,2	0,2	10	
19	0,2	0,2	15	
20	0,2	0,2	20	

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 4

PRÁTICA 13 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS: PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

INSTRUÇÕES:

1. **Calcular as concentrações de proteínas nas frações S1, P1, S2 e P2.**
2. **Construir os gráficos necessários para a determinação das atividades enzimáticas em cada uma das frações.**
3. **Determinar a atividade da α-glicosidase nas frações S1, P1, S2 e P2.**
4. **Calcular as atividades totais da α-glicosidase nas frações S1, P1, S2 e P2.**
5. **Calcular as atividades específicas da α-glicosidase nas frações S1, P1, S2 e P2.**
6. **Calcular a RECUPERAÇÃO nas frações S1, P1, S2 e P2.**
7. **Calcular o ENRIQUECIMENTO nas frações S1, P1, S2 e P2.**
8. **Escolher a fração com melhor RECUPERAÇÃO e ENRIQUECIMENTO.**

Planejamento 5

PRÁTICA 14 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA
Questões para Discussão

1. Definir cromatografia.
2. Quais os diversos tipos de cromatografia existentes?
3. O que é eluição?
4. Qual é o princípio da cromatografia de troca iônica?
5. Quais os tipos de resinas que podem ser utilizados numa cromatografia de troca iônica?
6. Qual a relação entre o valor de pH e a carga da resina?
7. Qual a relação entre o valor de pH e a carga da enzima a ser purificada?
8. Como definir o pH no qual se deve purificar a enzima? E a concentração de sal?
9. O que é eluição por gradiente salino?
10. O que é um gradiente salino contínuo?
11. O que é um gradiente salino descontínuo?
12. Como se faz experimentalmente cada um dos gradientes?

Discussão da *Prática 14*

13. Por que é necessária a remoção do sulfato de amônio antes de fazer a cromatografia?
14. Que outro método poderia ser utilizado para remover o sulfato de amônio?
15. O que é empacotamento de um resina? Como deve ser feito o empacotamento?
16. Que resina de troca iônica será utilizada na *Prática 15*?
17. Quais eluentes serão utilizados nesta cromatografia?
18. Por que se usará cromatografia de troca iônica para a purificação da enzima?
19. Construir um fluxograma detalhado da *Prática 15*.

Prática 14
Purificação de proteínas – cromatografia de troca iônica

Objetivo
Proceder a separação de proteínas utilizando resina de troca iônica.

Reagentes
água destilada
dietilaminoetilsephadex (DEAE-Sephadex)
fração escolhida (***P14***)
p-nitrofenil-α-glicosídeo (NPαGlc) 4 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7
reagente de Bradford
ácido fosfórico 85%
Coomassie Blue G®
metanol
Sephadex G-25®
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11
tampão fosfato 10 mM pH 6,8
tampão fosfato 10 mM pH 6,8 com NaCl 1 M

Materiais
banho de gelo
bastões de vidro
béqueres
espátulas
garras
lã de vidro
mangueiras
papel de filtro
pipetadores
pipetas
pipetas Pasteur 15 cm
(suporte da cromatografia)
ponteiras
presilhas
seringas
suportes para tubos de ensaio
suportes para as pipetas de Pasteur
tubos de centrífuga
tubos de ensaio
tubos Eppendorf
tubos Falcon 10 mL

Aparelhagens
banho 30°C
espectrofotômetro
vortice

Procedimento A – Extração do sulfato de amônio

1. Utilizar uma seringa como suporte da resina.
2. Colocar um pouco de lã de vidro no seu interior.
3. Compactar a lã de vidro na base utilizando um bastão de vidro.
4. Lavar a seringa com água destilada para retirar fragmentos de lã de vidro.
5. Homogeneizar com um bastão de vidro a suspensão contendo a resina.
   A quantidade de resina deve ser proporcional ao volume da amostra que deve ser adicionada: 1 mL de resina para 100 μL de amostra, aproximadamente.
6. Adicionar a suspensão.
7. Deixar decantar.
8. Repetir essa operação até a resina ocupar o interior da seringa.
9. Com a resina empacotada, lavá-la com 10 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,8.
10. **NUNCA DEIXAR A RESINA SECAR**.
11. Colocar a seringa dentro de um tubo de centrífuga.
12. Adicionar a fração escolhida na seringa
13. Centrifugar o conjunto seringa + tubo de ensaio a 800x *g* por 2 min.
14. Recolher o líquido do tubo de centrífuga.
15. Adicionar a solução em tubo(s) Eppendorf(s).

Procedimento B – Hidratação da DEAE-Sephadex

1. Pesar 0,5 g de DEAE-Sephadex em um béquer.
2. Adicionar 100 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,8.
3. Misturar bem utilizando um bastão de vidro.
4. Decantar de um dia para o outro.

Procedimento C – Montagem da coluna de troca iônica

Montagem física da coluna

1. Utilizar uma pipeta Pasteur de aproximadamente 15 cm como suporte da resina.
2. Prender a pipeta num suporte.
3. Colocar um pouco de lã de vidro no seu interior.
4. Compactar a lã de vidro na base utilizando um bastão de vidro.
5. Lavar a coluna com água destilada para retirar fragmentos de lã de vidro.
6. Adaptar uma mangueira de aproximadamente 6 cm na saída da pipeta.
7. Fechar a mangueira com uma presilha.

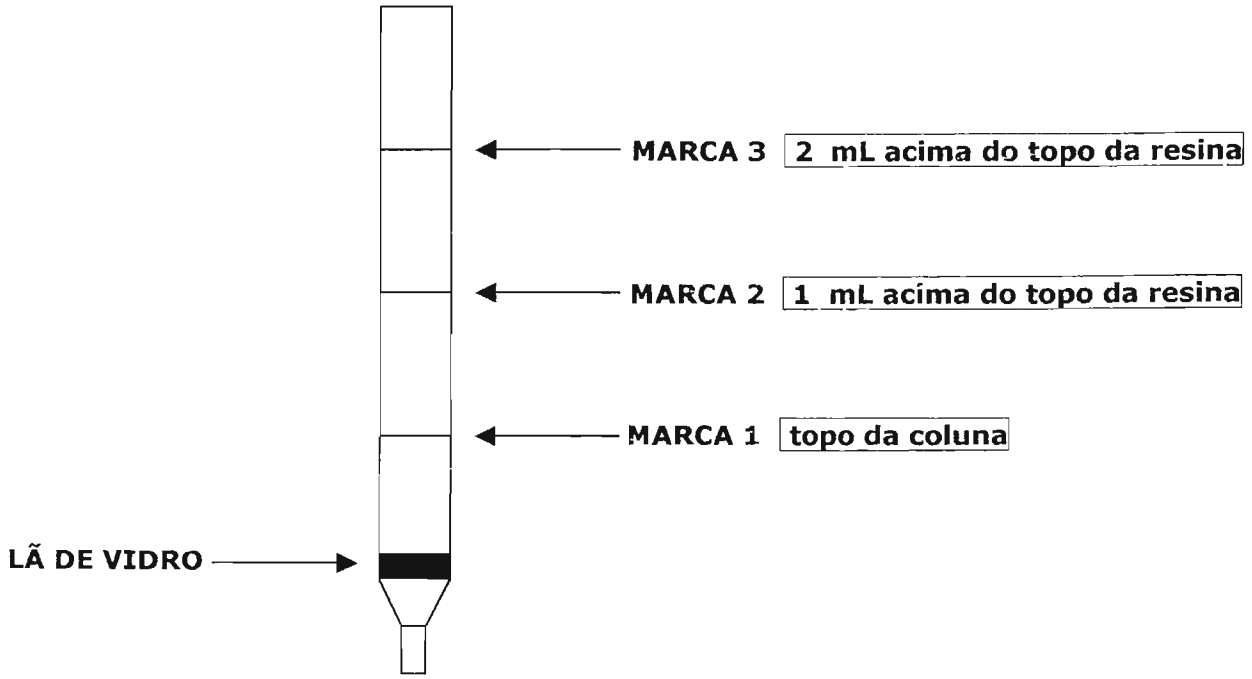
Processo de empacotamento

8. Fechar a presilha.
9. Com a coluna fechada, adicionar 1 mL de água destilada.
10. Marcar com uma caneta na pipeta Pasteur na altura do topo da coluna de água (**Marca 1**).
11. Esvaziar a coluna.
12. Fechar a presilha.
13. Homogeneizar com um bastão de vidro a suspensão contendo a resina (*Procedimento A*).
14. Adicionar a suspensão até a Marca 1.
15. Deixar decantar.
16. Repetir essa operação até a resina ocupar o interior da pipeta Pasteur até a Marca 1.
17. Com a resina empacotada, lavá-la com 20 mL de tampão fosfato 10 mM ***sem NaCl***.
18. Após a lavagem, fechar a presilha.
19. Deixar 3 mm de tampão acima do topo da resina. **NUNCA DEIXAR A RESINA SECAR.**

Preparação da coluna para a cromatografia

20. Adicionar 1 mL de tampão fosfato na coluna com a presilha fechada.
21. Marcar com uma caneta na pipeta Pasteur o topo da coluna de tampão (**Marca 2**).
22. Adicionar mais 1 mL de tampão fosfato e marcar novamente com uma caneta o topo da coluna de tampão (**Marca 3**).
23. Abrir a presilha e deixar drenar o tampão até restar 3 mm de tampão acima do topo da resina.
24. Fechar a presilha.

A coluna estará pronta para ser usada. A figura abaixo representa a situação final da coluna



Procedimento D – Cromatografia de troca iônica

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Aplicação da amostra

1. Diluir a fração escolhida tomando 0,4 mL da fração e adicionando 0,6 mL de tampão fosfato 10 mM ***sem NaCl***.
2. Verificar se a presilha está fechada.
3. Utilizar uma pipeta para transferir toda a amostra (devidamente diluída) homogeneamente para a coluna. ***A amostra deverá estar próxima à Marca 2***.
4. Abrir a presilha.
5. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina (Marca 1).
6. Fechar a presilha.

Eluição das proteínas não retidas pela coluna

7. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato ***sem NaCl*** até a Marca 3.
8. Abrir a presilha permitindo que o tampão flua pela resina.
9. Coletar cada mL (mililitro) em um tubo de ensaio.
10. Trocar o tubo de ensaio e adicionar mais 1 mL de tampão sempre que o tampão chegar à Marca 2.
11. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 8.
12. Adicionar ***cuidadosamente*** tampão até a Marca 3.
13. Coletar mais dois tubos, ***sem adicionar tampão***.
14. Ao final da coleta do tubo 10, a coluna do tampão deverá estar cerca de 3mm acima da Marca 1, ou seja, no topo da resina.

Eluição das proteínas retidas pela coluna

15. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato ***com NaCl*** até a Marca 3.
16. Abrir a presilha e permitir que o tampão flua pela resina.
17. Coletar cada mL (mililitro) em um tubo de ensaio.
18. Trocar o tubo de ensaio e adicionar mais 1 mL de tampão sempre que o tampão chegar à Marca 2.
19. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 18.
20. Adicionar tampão até a Marca 3.
21. Coletar mais dois tubos, ***sem adicionar tampão***.
22. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 20.

Procedimento E – Identificação das frações que contêm a α-glicosidase

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar em cada tubo os volumes de NPαGlc e eluatos da cromatografia (tubos numerados de 1 a 20) estipulados na **Tabela 1**. **Preparar os tubos em banho de gelo**.
2. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho de 30°C.
3. Incubar os tubos por 10 min.
4. Ao remover os tubos, adicionar em cada um 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
5. **Deixar os tubos em temperatura ambiente**.
6. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
7. Ler as absorbâncias a 420 nm ***nos tubos que apresentarem cor***.
8. Completar a **Tabela 2**.
9. Construir um gráfico que relacione absorbância e os números dos tubos.
10. Reunir os conteúdos dos tubos que apresentarem atividade enzimática em um tubo Falcon identificado como **MATERIAL DEAE**.

Tabela 1

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	tubos da cromatografia (mL)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,2	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,2	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,2	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	_	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
14	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
15	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
16	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
17	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
18	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
19	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
20	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2

Tabela 2

tubos	A_{420}	tubos	A_{420}
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Procedimento F – Determinação das atividades enzimáticas

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar em cada tubo de ensaio os volumes de NPαGlc e MATERIAL DEAE estipulados na **Tabela 3**. **Preparar os tubos em banho de gelo.**
2. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho a 30°C.
3. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 3**.
4. Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
5. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
6. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
7. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, ler as absorbâncias a 420 nm.
8. Completar a **Tabela 4**.
9. Calcular a atividade da α-glicosidade no Material DEAE.

Tabela 3

tubos	NPαGlc 4 mM (mL)	material DEAE (mL)	tempo (min)
1	0,2	0,2	5
2	0,2	0,2	10
3	0,2	0,2	15
4	0,2	0,2	20

Tabela 4

tubos	A_{420}
1	
2	
3	
4	

Procedimento G – Dosagem de proteínas

1. Adicionar em cada tubo os volumes de água e material DEAE estipulados na **Tabela 5**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Homogeneizar em vórtice
4. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
5. Ler as absorbâncias a 595 nm.
6. Completar a **Tabela 6**.

Tabela 5

tubos	material DEAE (mL)	água (mL)	reagente de Bradford (mL)
branco	-	1,0	1,0
1	0,1	0,9	1,0
2	0,3	0,7	1,0
3	0,5	0,5	1,0

Tabela 6

tubos	A_{595}	A_{595} ***corr.***
branco		
1		
2		
3		

Cálculos e Gráficos

1. Construir o gráfico necessário para a determinação da atividade enzimática no material DEAE. Expressar os resultados em *mU/mL*;
2. Em seguida, baseado na determinação de proteínas feita no material DEAE, determinar a atividade específica, em *mU/mg proteína*;
3. Calcular a recuperação da atividade e o enriquecimento após a cromatografia de troca iônica.

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 5

PRÁTICA 14 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

INSTRUÇÕES:

1. **Calcular a concentração de proteínas no *pool* de eluatos da cromatografia denominado MATERIAL DEAE.**
2. **Construir o gráfico necessário para a determinação da atividade enzimática no MATERIAL DEAE.**
3. **Determinar a atividade da α-glicosidase no MATERIAL DEAE.**
4. **Calcular a atividade total da α-glicosidase no MATERIAL DEAE.**
5. **Calcular a atividade específica da α-glicosidase no MATERIAL DEAE.**
6. **Calcular a RECUPERAÇÃO no MATERIAL DEAE.**
7. **Calcular o ENRIQUECIMENTO no MATERIAL DEAE.**

Planejamento 6

PRÁTICA 15 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – ELETROFORESE
Questões para Discussão

1. O que é eletroforese?
2. Conforme a figura abaixo, uma mistura de três proteínas cujos valores de pI são 4,0; 7,0 e 11,0 foi submetida a eletroforese. Usando-se tampões de valores de pH = 4,0; 7,0 e 11,0 esquematizar as posições relativas das três proteínas em cada tampão.

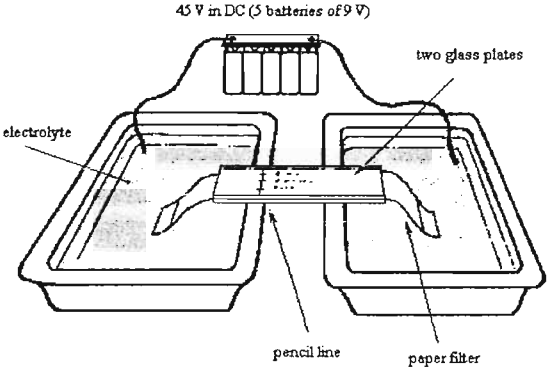
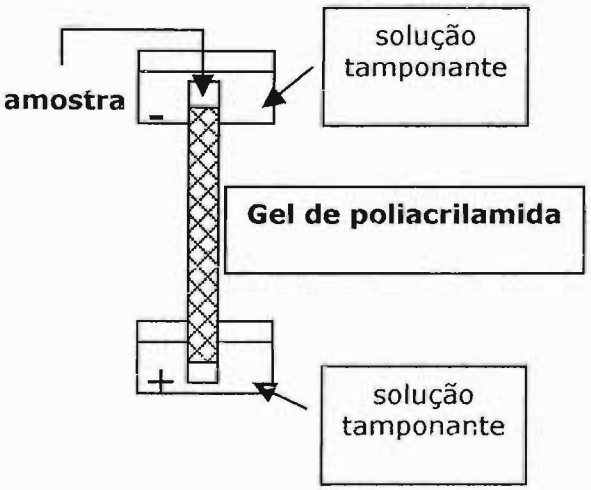


Figure 21 - Apparatus for paper electrophoresis.

http://www.funsci.com/fun3_en/exper1/exper1_21.gif

3. As proteínas contidas em uma mistura deverão ser separadas por eletroforese. Quais os elementos necessários para se fazer uma eletroforese eficaz?
4. Proteínas de mesma carga *correriam* a mesma distância numa eletroforese? Justificar.
5. Há alguma possibilidade de se separar proteínas diferentes só que de cargas iguais?
6. O que significa *SDS-PAGE*?
7. Uma amostra contendo duas proteínas (A e B) foi aplicada em uma eletroforese usando o dispositivo ilustrado abaixo. A proteína A apresenta um valor de pI = 4,0. A proteína B apresenta um valor de pI = 7,0.



a. A qual eletrodo estas proteínas migrariam em uma eletroforese efetuada num tampão de valor de pH = 2,0?
b. Em num tampão de valor de pH = 4,0?
c. Em num tampão de valor de pH = 7,0?
d. Em num tampão de valor de pH = 11,0?
e. Supondo que as proteínas A e B apresentem a mesma massa molar, representar a posição relativa entre estas proteínas em uma eletroforese efetuada num valor de pH = 8,0.
f. Caso haja dados sobre a massa molar de A e B seria possível construir a representação anterior?

g. A mesma amostra foi corrida numa eletroforese *SDS-PAGE*. Em direção à qual eletrodo estas proteínas deveriam migrar? Por que?
h. Supondo que a proteína A tenha o dobro da massa molar que a proteína B, representar a posição relativa entre estas proteínas numa eletroforese *SDS-PAGE*.
i. Supondo que a concentração de poliacrilamida do gel de *SDS-PAGE* anteriormente usado fosse aumentada de 10% para 20%, qual seria a posição relativa entre as proteínas A e B? Comparar a posição relativa nos dois géis de concentração diferentes.

Discussão da *Prática 15*

8. Que soluções serão usadas na *Prática 15*? Quais sua funções?
9. Qual a função do gel de separação?
10. Qual a função do gel de empilhamento?
11. Por que os géis contém SDS?
12. Conforme as tabelas explicar as semelhanças e diferenças entre os géis de separação (Tabela 1) e empilhamento (Tabela 2).

Tabela 1

soluções	volume
água	4,02 mL
SDS 100 g/L	100 µL
solução A	3,33 mL
solução B	2,5 mL
temed	5 µL
persulfato de amônio	50 µL
VOLUME TOTAL	

Tabela 2

soluções	volume
água	3,05 mL
SDS 100 g/L	50 µL
solução A	0,65 mL
solução C	1,25 mL
temed	5 µL
persulfato de amônio	25 µL
VOLUME TOTAL	

13. Explicar como haverá a formação do gel de poliacrilamida.
14. Faça um FLUXOGRAMA DETALHADO da Prática 15.

Prática 15
Purificação de proteínas – eletroforese

Objetivos
Verificar a eficiência das etapas de purificação da α-glicosidase.

Reagentes
ácido acético
ácido clorídrico
acrilamida
água destilada
azul de bromofenol 5 g/L
Coomassie Blue R®
dodecil-sulfato de sódio (SDS) 100 g/L
glicerol
glicerol 50 g/L
glicina
lisado de levedura (***P6***)
material DEAE (***P15***)
β-mercaptoetanol
metanol
N',N'-bis metilenoacrilamida
N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamino (TEMED)
persulfato de amônio 100 g/L
precipitado P2 (***P13***)
tris

Materiais
anéis de borracha
barras magnéticas
béqueres
cola para vedação
cubas de eletroforese
kit para montagem de géis
luvas
membranas de diálise
micropipetadores
microtubos (Eppendorf®)
pipetas
pipetas Pasteur
placas de Petri
ponteiras
suportes de isopor
suportes para tubos
tubos de ensaio

Aparelhagens
Agitador magnético
banho fervente
concentrador a vácuo (*Speedvac®*)
fonte de eletroforese

Composição das soluções e tampões

solução A

acrilamida	29,2 g
N'N'bis metilenoacrilamida	0,80 g
água qsp	100 mL

solução B
tris 1,5 M pH 8,8
(acertar valor de pH com HCl)

solução C
tris 0,5 M pH 6,8
(acertar valor de pH com HCl)

tampão de amostra

água	3,55 mL
solução C	1,25 mL
glicerol	2,50 mL
SDS 100 g/L	2,00 mL
azul de bromofenol 5 g/L	0,20 mL
β-mercaptoetanol	0,05 mL

tampão de corrida

tris	3,03 g
glicina	14,4 g
SDS	1,0 g
água qsp	1 L

Obs.: Não acertar o pH desta solução tampão.

solução de coloração

Coomassie blue R®	0,1 g
metanol	40 mL
ácido acético	10 mL
água qsp	50 mL

solução de descoloração

metanol	40 mL
ácido acético	10 mL
água qsp	50 mL

Procedimento A – Preparação das amostras

Cálculo das quantidades necessárias das amostras para a eletroforese

1. Aplicar as seguinte amostras no gel de SDS-PAGE:
   a. lisado de *Saccharomyces cerevisiae* (***P6***);
   b. fração escolhida da precipitação com sulfato de amônio (***P13***);
   c. *pool* dos eluatos da cromatografia com atividade enzimática, denominado Material DEAE (***P14***);
   d. aplicar quaisquer outras frações desejadas.
2. Fazer os cálculos necessários para as amostras que serão aplicadas. Para isso, é necessário saber que:
   a. Deverá ser aplicado em cada poço do gel um volume máximo de 20 μL.
   b. Esse volume deverá conter aproximadamente 20 μg de proteína.

Diálise das amostras

3. Transferir para um microtubo o volume calculado de amostra.
4. Identificar o microtubo com:
   a. Nome da amostra.
   b. Número do grupo.
5. Adicionar água, caso necessário, até completar 600 μL.
6. Cobrir o microtubo com um pedaço de membrana de diálise.
7. Prender a membrana de diálise com um anel de borracha.
8. Transferir o microtubo para um suporte de isopor.
9. Colocar o suporte dentro de um béquer contendo água.
10. Manter sob agitação por pelo menos 16 horas.

Secagem a vácuo

11. Após a diálise, transferir as amostras para um concentrador a vácuo.
12. Secar as amostras.

Desnaturação das proteínas presentes nas amostras

13. Transferir para cada microtubo 20 μL de tampão de amostra.
14. Transferir os microtubos para um banho fervente.
15. Incubar os microtubos por 5 min.
16. Retirar os microtubos.
17. Aplicar as amostras no gel de eletroforese com o auxílio de micropipetadores.

Procedimento B – Preparação do gel de SDS-PAGE

Preparação do gel de separação

1. Adicionar em um tubo os volumes estipulados na **Tabela 1**.
2. Homogeneizar rapidamente.
3. Transferir a mistura, utilizando uma pipeta Pasteur, para as placas de vidro previamente montadas.
4. Aguardar a polimerização – cerca de 60 min.
5. Colocar o ***pente*** sobre entre as placas de vidro.

Preparação do gel de empilhamento

6. Após a polimerização do gel de separação, adicionar em outro tubo os volumes estipulados na **Tabela 2**.
7. Homogeneizar rapidamente.
8. Transferir a mistura, utilizando uma pipeta Pasteur, para as placas de vidro (com o *pente*) contendo o gel de separação polimerizado.
9. Aguardar a polimerização – cerca de 40 min.
10. Após a polimerização do gel de empilhamento, retirar cuidadosamente o pente.
11. Adicionar o tampão de corrida.

Tabela 1

soluções	volume
água	4,02 mL
SDS 100 g/L	100 μL
solução A	3,33 mL
solução B	2,5 mL
TEMED	5 μL
persulfato de amônio	50 μL

Tabela 2

soluções	volume
água	3,05 mL
SDS 100 g/L	50 μL
solução A	0,65 mL
solução C	1,25 mL
TEMED	5 μL
persulfato de amônio	25 μL

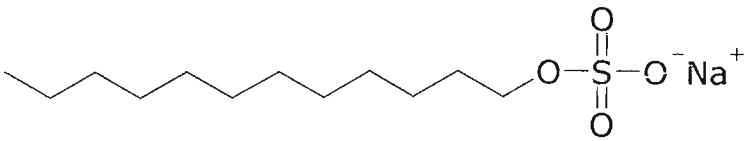
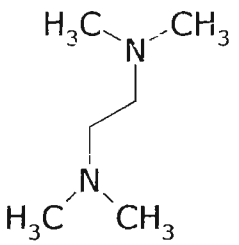
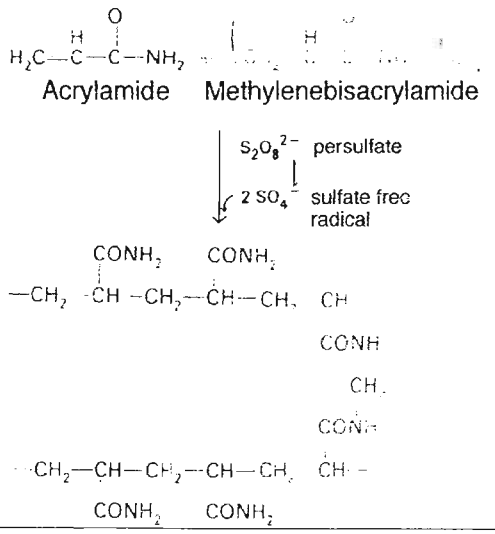
Procedimento C – Eletroforese, coloração e descoloração

1. Correr a eletroforese com 100V, durante aproximadamente 40 min.
2. Desligar a fonte quando o corante marcador de frente atingir a base do gel.
3. Desconectar os cabos.
4. Retirar o gel.
5. Colocar o gel no frasco contendo a solução de coloração.
6. Corar o gel por 40 min.
7. Retirar o gel do frasco de coloração.
8. Colocar o gel no frasco contendo a solução de descoloração.
9. Descorar o gel.
10. Visualizar as bandas de proteínas.

Procedimento D – Desidratação do gel

1. Colocar o gel num frasco contendo água.
2. Trocar tantas vezes quanto for necessário a água do frasco até a remoção completado ácido acético.
3. Retirar o gel hidratado do frasco com água.
4. Colocar o gel num frasco contendo solução de glicerol 50 g/L.
5. Molhar com a solução de glicerol lâminas de celofane natural
6. Dispor as folhas de celofane sobre placas ***limpas*** de vidro.
7. Colocar os géis sobre as lâminas de celofane devidamente hidratadas e limpas.
8. Colocar outra folha de celofane previamente hidratada sobre o gel, formando assim um sanduíche.
9. Retirar delicadamente as bolhas de ar que estiverem aprisionados pelas folhas de celofane.
10. Esticar as folhas e prendê-las.
11. Deixar secar à temperatura ambiente.

FÓRMULAS ESTRUTURAIS E MASSAS MOLARES

<table>
<tr><td colspan="2">SDS (288,38 g/mol)
  </td><td>TEMED (116,20 g/mol)
  </td></tr>
<tr><td colspan="3">CONVERSÃO DE PERSULFATO EM ÍON SULFATO
$S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{-*}$</td></tr>
<tr><td>REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO DA ACRILAMIDA E COM A BIS-ACRILAMIDA</td><td colspan="2"> 
</td></tr>
</table>

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 6

PRÁTICA 15 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – ELETROFORESE

INSTRUÇÕES:

1. **Identificar a banda correspondente à α-glicosidase no gel de *SDS-PAGE*.**
2. **Calcular a massa molar provável da enzima através dos padrões utilizados na eletroforese.**

Planejamento 7

PRÁTICA 16 - SEQÜENCIAMENTO DE PROTEÍNAS – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
Questões para Discussão

1. Utilizando como referência a animação sobre seqüenciamento de proteínas, esquematizar as etapas do seqüenciamento utilizando a *degradação de Edman*. Incluir desde a desnaturação da amostra até a reação de seqüenciamento.
2. O que significa composição de aminoácidos de uma proteína? E estrutura primária de uma proteína? Destacar as diferenças entre elas.
3. Submetendo uma proteína à hidrólise ácida (HCl 6M, 3h, 115°C) é possível obter sua estrutura primária? Por que?
4. A *degradação de Edman* pode ser usada no seqüenciamento da extremidade amino e carboxi-terminal de uma proteína?
5. A hemoglobina é formada por dois tipos de cadeia polipeptídica (α e β) que apresentam diferentes estruturas primárias. Esta proteína pode ser submetida diretamente ao seqüenciamento pela *degradação de Edman*? Propor um protocolo para seqüenciamento da hemoglobina.
6. A reação de *degradação de Edman*, devido ao rendimento menor que 100% em cada ciclo, é utilizada para a obtenção de seqüências de peptídeos com cerca de 50 - 70 aminoácidos. Baseado neste fato propor uma estratégia para obtenção da estrutura primária de uma proteína com 500 aminoácidos.
7. Para o seqüenciamento de um polipeptídeo, uma amostra foi submetida à digestão com duas diferentes proteases (tripsina e quimotripsina). Os peptídeos obtidos foram purificados e então submetidos ao seqüenciamento pela *degradação de Edman*. Obtiveram-se os seguintes resultados:

peptídeos gerados pela tripsina	peptídeos gerados pela quimotripsina
DNPETR	MADF
GMFR	RDNPETRGMF
AGT	RAGT
MADFR	

A reação entre o polipeptídeo completo e 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNF) gerou como produto uma metionina ligada a um grupo dinitrofenol.
Montar a estrutura primária do polipeptídeo.

Discussão da *Prática 16*

8. Após leitura cuidadosa da *Prática 16* e do texto abaixo, construir um fluxograma detalhado do processo de identificação do peptídeo desconhecido, identificando as etapas de seqüenciamento, separação e revelação.

Seqüenciamento de proteínas
O seqüenciamento de proteínas pode ser feito utilizando-se a *degradação de Edman*. A determinação do aminoácido N-terminal pode ser feita através da modificação deste aminoácido através da reação com fenilisotiocianato (PITC) em meio alcalino, seguido de hidrólise com ácido trifluoroacético (TFA). O aminoácido modificado é extraído com solvente orgânico e, em meio ácido, se transforma em feniltioidantoína. Esta é identificada por TLC (*thin layer cromatography* - cromatografia em camada delgada), HPLC (*high pressure/performance liquid cromatography* - cromatografia líquida de alta pressão/eficiência) ou algumas outras. Outros compostos reagem com amino grupos e permitem a identificação do aminoácido terminal de proteínas. Um deles é o 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNF).
Cromatografia de camada delgada
A separação de uma mistura de aminoácidos por cromatografia em camada delgada (TLC) de sílica baseia-se em adsorção e partição. Neste caso, a fase estacionária é uma camada fina de sílica-gel fixada a uma placa de vidro, plástico ou alumínio.
A TLC é uma técnica útil para a análise e separação de aminoácidos, peptídeos e derivados de ambos ou para a determinação da pureza destes compostos. Na etapa de separação empregam-se fases móveis com diferentes composições de solventes: clorofórmio/metanol/acido acético, clorofórmio/metanol, clorofórmio/ácido acético, entre outras.
Revelação
A revelação dos compostos separados pode ser feita com diferentes reagentes. Alguns deles, como a ninidrina, fluorescamina e a mistura hipoclorito de sódio/etanol/iodeto de potássio/o-toluidina reagem especificamente com os grupamentos α-amino de aminoácidos. Outros são específicos para determinados grupos químicos presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos: iodoplatinato de sódio para grupos SH e o reativo de Sakaguchi (sprays alternados de α-naftol e hipoclorito de sódio) para arginina.

Prática 16
Seqüenciamento de proteínas – cromatografia em camada delgada

Objetivos
Após o isolamento e purificação da α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, o passo natural na sua caracterização seria a análise da sua estrutura primária, isto é, seu seqüenciamento. Como este objetivo é impossível de ser atingido no período disponível em laboratório optou-se por caracterizar e identificar um peptídeo mais simples, tomado como modelo.
Para tanto serão feitas:
(1) a hidrólise ácida do peptídeo e a cromatografia dos aminoácidos resultantes em camada delgada;
(2) a derivatização do peptídeo com 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNF), sua hidrólise e subseqüente cromatografia em camada delgada.

Reagentes
ácido acético
ácido clorídrico 6M
aspartato (Asp) 10 g/L em ácido clorídrico 6M
aspartato (Asp) derivatizado
bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) 14g/L
clorofórmio
2,4-dinitrofluorobenzeno (DNF) 50g/L em etanol
etanol
fenilalanina (Phe) 10 g/L em ácido clorídrico 6M
fenilalanina (Phe) derivatizada
glicina (Gly) 10 g/L em ácido clorídrico 6M
glicina (Gly) derivatizada
metanol
ninidrina 20 g/L em etanol
peptídeo desconhecido
sílica-gel

Materiais
borrifador
capilares de vidro
cuba de vidro com tampa para cromatografia
lápis
luvas
papel de filtro
placas de vidro com sílica-gel de 0,25 mm de espessura
proveta
suporte para tubos
tubos com tampa de rosca

Aparelhagens
balança
banho 30°C
banho fervente
bloco térmico
bomba de vácuo/pressão
estufa
secador

CUIDADOS ESPECIAIS – LEIA COM ATENÇÃO ANTES DE INICIAR A PRÁTICA

Usar luvas durante as etapas de aplicação das amostras, revelação e manipulação do DNF e ninidrina.

Não tocar na camada delgada em nenhuma destas etapas.

Não assoprar, falar ou espirrar sobre a camada delgada.

Não inalar o pó que se desprende da placa quando manuseada incorretamente.

Procedimento A – Determinação da composição em aminoácidos de um peptídeo

Preparação da fase móvel

Fase móvel: clorofórmio/metanol/ácido acético 60:30:10 (v/v/v).

1. Adicionar na proveta os volume necessários de clorofórmio, metanol e ácido acético tal que ao final haja 50 mL de fase móvel.
2. Colocar a fase móvel na cuba de vidro contendo um pedaço de papel de filtro na parede da cuba.
3. Fechar imediatamente a cuba.
4. Aguardar 10 min para usá-la.

Hidrólise total em meio ácido do peptídeo desconhecido.

5. Pesar 10 mg do peptídeo desconhecido.
6. Colocá-lo num tubo com tampa de rosca.
7. Adicionar ao tubo 1 mL de ácido clorídrico 6M.
8. Fechar o tubo.
9. Homogeneizar em vórtice.
10. Transferir o tubo para um bloco térmico a 115°C.
11. Incubar o tubo por 3h.
12. Retirar o tubo após esse período.
13. Resfriar o tubo em temperatura ambiente.

Preparação da placa de sílica

14. Fazer uma marca com um lápis **APENAS** nas bordas laterais da placa a 2,5 cm da borda inferior da sílica. **Cuidado para não cortar a sílica**. A linha imaginária será a origem da aplicação das amostras.

Cromatografia em camada delgada

15. Aplicar na placa com o auxílio de um capilar de vidro, em pontos distintos, cerca de 10 μL das soluções de aminoácidos e do peptídeo hidrolisado.
16. Secar as manchas com secador.
17. Abrir a cuba contendo a fase móvel.
18. Colocar a placa de vidro contendo as amostras em contato com o solvente. ***Segurar a placa pela parte superior***.
19. Fechar a cuba contendo a fase móvel.
20. Aguardar até a fase móvel atingir 2 cm abaixo da borda superior da placa.
21. Retirar a placa da cuba.
22. Marcar com o lápis alinha de frente do solvente.
23. Deixar o solvente evaporar espontaneamente na capela.

Revelação e cálculo do R_f

24. Apoiar a placa sobre a superfície da capela e segurá-la verticalmente.
25. Borrifar a solução de ninidrina sobre toda a placa cerca de 15 cm de distância. Usar luvas durante essa etapa.
26. Colocar a placa na estufa a cerca de 80°C.
27. Aguardar 10 min.
28. Retirar as placas da estufa.
29. Deixar as placas resfriarem.
30. Medir a distância total percorrida pelo solvente e as distâncias percorridas pelos padrões e produtos de hidrólise para a determinação do R_f dos compostos.
31. O R_f é dado por:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

Procedimento B – determinação do aminoácido amino-terminal de um peptídeo

Preparação da fase móvel

Fase móvel: clorofórmio/metanol/ácido acético 95:5:1 (v/v/v).

1. Adicionar na proveta os volume necessários de clorofórmio, metanol e ácido acético tal que ao final haja 50 mL de fase móvel.
2. Colocar a fase móvel na cuba de vidro contendo um pedaço de papel de filtro na parede da cuba.
3. Fechar imediatamente a cuba.
4. Aguardar 10 min para usá-la.

Determinação do aminoácido amino-terminal do peptídeo desconhecido

5. Pesar 10 mg do peptídeo desconhecido.
6. Colocá-lo num tubo com tampa de rosca.
7. Adicionar ao tubo 0,75 mL de bicarbonato de sódio.
8. Adicionar ao tubo 0,5 mL de DNF.
9. Fechar o tubo.
10. Transferir o tubo para um banho a 30°C.
11. Incubar o tubo por 3h.
12. Retirar o tubo após esse período.
13. Resfriar o tubo.
14. Acidificar o meio com duas gotas de ácido clorídrico 6M.
15. Transferir o tubo para um banho fervente.
16. Incubar o tubo por 15 min para secar o etanol.
17. Retirar o tubo após esse período.
18. Adicionar ao tubo 1 mL de ácido clorídrico 6M.
19. Transferir o tubo para um bloco térmico.
20. Incubar o tubo por 3h.
21. Retirar o tubo após esse período.
22. Resfriar o tubo em temperatura ambiente.
23. Retirar 50 μL de peptídeo derivatizado e adicioná-lo num tubo de ensaio.
24. Transferir o tubo de ensaio para um banho fervente.
25. Aguardar a amostra secar completamente.
26. Retirar o tubo após esse período.
27. Resfriar o tubo.
28. Adicionar 20 μL de etanol ao tubo contendo o produto seco da hidrólise.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Preparação da placa de sílica

29. Fazer uma marca com um lápis **APENAS** nas bordas laterais da placa a 2,5 cm da borda inferior da sílica. **Cuidado para não cortar a sílica**. A linha imaginária será a origem da aplicação das amostras.

Cromatografia em camada delgada

30. Aplicar na placa com o auxílio de um capilar de vidro, em pontos distintos, cerca de 10 μL dos padrões derivatizados de aminoácidos e do peptídeo derivatizado.
31. Secar as manchas com secador.
32. Abrir a cuba contendo a fase móvel.
33. Colocar a placa de vidro contendo as amostras em contato com o solvente. ***Segurar a placa pela parte superior***.
34. Fechar a cuba contendo a fase móvel.
35. Aguardar até a fase móvel atingir 2 cm abaixo da borda superior da placa.
36. Retirar a placa da cuba.
37. Marcar com o lápis a linha de frente do solvente.
38. Deixar o solvente evaporar espontaneamente na capela.
39. ***Não*** é necessário aplicar revelador pois os produtos derivatizados têm cor.
40. Medir a distância total percorrida pelo solvente e as distâncias percorridas pelos padrões e produtos derivatizados para a determinação do R_f dos compostos.
41. O R_f é dado por:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

Planejamento 8

PRÁTICA 17 - MEMBRANAS – COMPARTIMENTALIZAÇÃO DE AZUL DE METILENO EM VESÍCULAS UNILAMELARES DE FOSFATIDILCOLINA
PRÁTICA 18 - CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS – DETERMINAÇÃO DO PONTO DE AÇÃO DE DROGAS

Questões para Discussão

Membranas biológicas
As membranas biológicas cumprem inúmeras funções: organizam moléculas em diferentes compartimentos, limitam micro-ambientes adequados para funções vitais e controlam o transporte de várias substâncias. Visando uma simplificação estrutural e química das membranas naturais foram propostos diversos sistemas modelo de membrana.
Vesículas
Lipídios extraídos de membranas podem ser utilizados para a preparação de diversos sistemas reconstituídos que permitem reproduzir, de forma selecionada e simplificada, alguns dos fenômenos que ocorrem em membranas naturais.
Lipossomos são constituídos por múltiplas bicamadas concêntricas de fosfolipídios e podem ser formados por simples agitação de lipídios em fase aquosa. Os lipossomos têm sido utilizados para medir permeação passiva de vários íons e moléculas. Como a maior parte do lipídio está presente na forma multilamelar, o volume seqüestrado por mol de lipídio é comparativamente menor do que o de vesículas unilamelares (a eficiência de incorporação é relativamente baixa em comparação com aquela de uma população de vesículas).
Lipossomos unilamelares
Após sonicação (agitação por vibrações ultra-sônicas) os lipossomos se rearranjam formando vesículas formadas por uma bicamada de fosfolipídios que contém água no seu compartimento interno. O diâmetro das vesículas pode variar entre 250Å até mais de 2.000Å dependendo do método de preparação. A presença de um compartimento aquoso interno, isolado do ambiente externo pela membrana fosfolipídica que é pouco permeável, permite incorporar compostos hidrossolúveis nesse compartimento e mantê-los isolados da fase aquosa externa.
Å = angströn. 1Å = 10^{-10}m

1. Qual a estrutura de uma dupla camada lipídica?
2. Qual a estrutura de uma vesícula?
3. Qual a estrutura de uma micela?
4. Qual a estrutura de um lipossomo?
5. Como é o modelo de Singer e Nicholson de membranas biológicas?
6. Que características estruturais são necessárias para a incorporação de um composto no compartimento aquoso interno de uma vesícula? E na membrana?
7. Lipossomos são utilizados para veiculação de medicamentos. Que métodos poderiam ser usados para separar as vesículas contendo uma proteína (Massa Molar = 35 kD, hidrofílica) da proteína não incorporada?
8. Calcular o número de monômeros na membrana externa e interna de vesículas de lecitina com um diâmetro de 200 nm. Levar em conta que a área por cabeça do monômero é 0,7 nm^2 e que a espessura da bicamada é de 4 nm.
9. Fazer um esquema da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, localizando a posição dos aceptores e doadores de elétrons, de acordo com seu potencial redox.

Discussão das *Práticas 17 e 18*

10. Na *Prática 17*, qual a função da Sephadex G-25 Medium®?
11. Na *Prática 17*, qual a função do colesterol na bicamada?
12. Na *Prática 17*, por que é necessário saturar previamente a coluna com lipídio?
13. Na *Prática 17*, que tipo de cromatografia é utilizado nesta prática?
14. Na *Prática 17*, qual é a função do Triton X-100®?
15. Na *Prática 18*, por que a fonte de carbono utilizada nesta prática é galactose e não glicose?
16. Na *Prática 18*, qual a função do sorbitol no tampão com sorbitol?
17. Na *Prática 18*, qual a função do succinato no tampão com succinato?
18. Na *Prática 18*, qual a função do óleo mineral?
19. Na *Prática 18*, quais as finalidades dos tubos 1, 2 e 3 no procedimento D?
20. Na *Prática 18*, no caso dos tubos 4, 5 e 6 do procedimento D, após decorrido um intervalo de tempo, qual deverá ser o estado de oxidação dos aceptores/doadores utilizados? Qual coloração deverá ser observada?

Prática 17
Membranas – compartimentalização de azul de metileno em vesículas unilamelares de fosfatidilcolina

Objetivos
Estudar a compartimentalização que uma membrana promove, separando um volume aquoso do meio ambiente. A preparação de vesículas de fosfatidilcolina será feita por sonicação em banho com um meio contendo azul de metileno seguida pela separação das vesículas do excesso de corante presente na fase aquosa externa por cromatografia.

Reagentes	**Materiais**		**Aparelhagens**
água destilada	banho de gelo	pipetas	balança
azul de metileno (AM) 5 mM em NaCl 95 mM	bastão de vidro	ponteiras	banho a 50°C
cloreto de sódio 100 mM	béqueres	presilha	bomba de vácuo
colesterol	canetas	suporte para coluna de vidro	espectrofotômetro
diclorometano	colunas de vidro	suporte para tubos de ensaio	fluxo de ar (ou N_2)
lecitina de ovo	dessecadores	tubo de ensaio	sonicador de banho
Sephadex G-25 Medium®	lã de vidro	tubo para sonicador	sonicador de *tip*
Triton X-100®	mangueira		vórtice
	pipetadores		

Procedimento A – Hidratação da Sephadex G-25 Medium®

1. Pesar 1,0 g de Sephadex G-25 Medium® em um béquer.
2. Adicionar 20 mL de NaCl 100 mM.
3. Misturar bem utilizando um bastão de vidro.
4. Decantar de um dia para o outro.

Procedimento B – Montagem da coluna de troca iônica

Montagem física da coluna

1. Utilizar uma coluna de vidro de aproximadamente 20 cm de altura e 0,8 cm de diâmetro como suporte da resina.
2. Prender a coluna num suporte.
3. Colocar um pouco de lã de vidro no seu interior.
4. Compactar a lã de vidro na base utilizando um bastão de vidro.
5. Lavar a coluna com água destilada para retirar fragmentos de lã de vidro.
6. Adaptar uma mangueira de aproximadamente 6 cm na saída da pipeta.
7. Fechar a mangueira com uma presilha.
8. Adicionar NaCl 100 mM suficiente para encobrir a lã de vidro.
9. Retirar as bolhas de ar utilizando um bastão de vidro.

Processo de empacotamento

10. Fechar a presilha.
11. Com a coluna fechada, adicionar 4,5 mL de NaCl 100 mM.
12. Marcar com uma caneta na coluna na altura do topo da coluna de água (**Marca 1**).
13. Esvaziar a coluna.
14. Fechar a presilha.
15. Homogeneizar com um bastão de vidro a suspensão contendo a resina (*Procedimento A*).
16. Adicionar a suspensão até a Marca 1.
17. Deixar decantar.
18. Repetir essa operação até a resina ocupar o interior da coluna até a Marca 1.
19. Escoar o líquido.
20. Deixar 3 mm de líquido acima do topo da resina. **NUNCA DEIXAR A RESINA SECAR.**

Preparação da coluna para a cromatografia

21. Adicionar 1 mL de NaCl 100 mM na coluna.
22. Marcar com uma caneta o topo da coluna de solução (**Marca 2**).
23. Adicionar mais 1 mL de NaCl 100 mM na coluna.
24. Marcar com uma caneta o topo da coluna de solução (**Marca 3**).
25. Abrir a presilha e deixar drenar solução até restar 3 mm de tampão acima do topo da resina.
26. Fechar a presilha.

Procedimento C – Preparação das vesículas e saturação da coluna

Formação das vesículas

1. Pesar numa balança 7,5 mg de lecitina e 1,5 mg de colesterol.
2. Colocar as substâncias em tubo de ensaio grande (cerca de 15 cm).
3. Adicionar 0,5 mL de diclorometano. ***Cuidado: diclorometano é extremamente volátil.***
4. Solubilizar as substâncias. ***Cuidado: diclorometano é extremamente volátil.***
5. Evaporar o solvente, ***formando um filme muito fino na parede do tubo***, utilizando um fluxo de ar ou fluxo de nitrogênio.
6. Colocar o tubo dentro de um dessecador.
7. Conectar o dessecador a uma bomba de vácuo.
8. Ligar a bomba de vácuo
9. Deixar o tubo por pelo menos 1 h dentro do dessecador para eliminação total do solvente.
10. Desligar a bomba de vácuo.
11. Retirar o tubo do dessecador.
12. Adicionar ao tubo 0,5 mL de NaCl 100 mM.
13. Transferir o tubo para banho a 50°C.
14. Manter o tubo em banho por 5 min.
15. Retirar o tubo do banho.
16. Homogeneizar em vórtice algumas vezes até que todo o filme tenha sido retirado da parede do tubo.
17. Transferir a solução contendo os lipossomos multilamelares para um tubo apropriado para sonicação.
18. Transferir o tubo para sonicador de *tip*.
19. Sonicar por 5 min a uma potência de 100 W.
20. Retirar o tubo do sonicador.
21. Manter o tubo em banho de gelo para evitar a decomposição dos fosfolipídios.

Saturação da coluna

22. Transferir 0,5 mL da suspensão de lipossomos unilamelares à coluna.
23. Abrir a presilha.
24. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina.
25. Lavar a coluna com NaCl 100 mM até que a turvação desapareça do eluato.
26. Ao final deixar drenar a solução até restar 3 mm de tampão acima do topo da resina.

A coluna estará pronta para ser usada.

Procedimento D – Preparação das vesículas com azul de metileno

1. Pesar numa balança 12 mg de lecitina e 2,4 mg de colesterol.
2. Colocar as substâncias em tubo de ensaio grande (cerca de 15 cm).
3. Adicionar 0,8 mL de diclorometano. ***Cuidado: diclorometano é extremamente volátil.***
4. Solubilizar as substâncias. ***Cuidado: diclorometano é extremamente volátil.***
5. Evaporar o solvente, ***formando um filme muito fino na parede do tubo***, utilizando um fluxo de ar ou fluxo de nitrogênio.
6. Colocar o tubo dentro de um dessecador.
7. Conectar o dessecador a uma bomba de vácuo.
8. Ligar a bomba de vácuo
9. Deixar o tubo por pelo menos 1 h dentro do dessecador para eliminação total do solvente.
10. Desligar a bomba de vácuo.
11. Retirar o tubo do dessecador.
12. Adicionar ao tubo 0,8 mL de azul de metileno 5 mM em NaCl 95 mM.
13. Transferir os tubos para banho a 50°C.
14. Manter o tubo em banho por 5 min.
15. Retirar o tubo do banho.
16. Homogeneizar em vórtice algumas vezes até que todo o filme tenha sido retirado da parede do tubo.
17. Transferir a solução contendo os lipossomos multilamelares para um tubo apropriado para sonicação.
18. Transferir o tubo para sonicador de banho.
19. Sonicar por 5 min a uma potência de 400 W.
20. Retirar o tubo do sonicador.
21. Manter o tubo em banho de gelo para evitar a decomposição dos fosfolipídios.

Procedimento E - Cromatografia

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Aplicação da amostra

1. Transferir 0,2 mL da suspensão de lipossomos unilamelares para a coluna..
2. Abrir a presilha.
3. Coletar 0,2 mL de eluato em um tubo de ensaio denominado **Tubo 1**.
4. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina (**Marca 1**).
5. Fechar a presilha.
6. Adicionar 0,2 mL de NaCl 100 mM na coluna.
7. Abrir a presilha.
8. Coletar 0,2 mL de eluato no **Tubo 1**.
9. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina (**Marca 1**).
10. Fechar a presilha.
11. Adicionar 0,6 mL de NaCl 100 mM na coluna.
12. Abrir a presilha.
13. Coletar 0,6 mL de eluato ainda no **Tubo 1**.
14. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina (**Marca 1**).
15. Fechar a presilha.

Eluição do AM e das vesículas + AM

16. Adicionar cuidadosamente NaCl 100 mM até a Marca 3.
17. Abrir a presilha permitindo que a solução flua pela resina.
18. Coletar cada mL (mililitro) em um tubo de ensaio numerado.
19. Trocar o tubo de ensaio e adicionar mais 1 mL de tampão sempre que o tampão chegar à Marca 2.
20. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 13.
21. Adicionar solução até a Marca 3.
22. Coletar mais dois tubos, ***sem adicionar solução***.
23. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 15.

Procedimento F – Leitura das absorbâncias e cálculo de incorporação

1. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
2. Ler as absorbâncias de todos os tubos a 660 nm.
3. Caso a absorbância de qualquer tubo seja maior que 0,8, diluir a amostra adicionando na cubeta para leitura 0,1 mL do eluato e 0,9 de NaCl 100 mM (Proceder aos cálculos de diluição).
4. Após a leitura de todos os tubos transferir 0,5 mL de cada tubo contendo vesículas para outro tubo de ensaio.
5. Adicionar 0,1 mL de Triton X-100 10% e 0,4 mL de NaCl 100 mM.
6. Homogeneizar fortemente.
7. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
8. Ler as absorbâncias dos novos tubos a 660 nm.
9. Corrigir as absorbâncias dos novos tubos devido à diluição com Triton X-100 e NaCl 100 mM.
10. Fazer um gráfico relacionando absorbância versus número dos tubos.
11. Calcular a porcentagem de incorporação de azul de metileno nas vesículas através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Incorporação} = 100 \times \frac{\Sigma\,(\text{Abs Vesículas+AM})}{\Sigma\,(\text{Abs TOTAL})}$$

onde:

Σ **(Abs Vesículas + AM)** = soma das absorbâncias dos tubos contendo vesículas após a adição de Triton X-100 (***Importante***: a absorbância deve ser corrigida pela diluição);

Σ **(Abs TOTAL)** = Σ (Abs Vesículas + AM) + Σ (Abs Tubos sem Vesículas)

Prática 18
Cadeia de Transporte de Elétrons – determinação do ponto de ação de drogas

Objetivo
Determinar o ponto de ação de uma droga desconhecida utilizando mitocôndrias de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes
ácido clorídrico
água destilada
azul de metileno 0,06 g/L
cepa *S. cerevisiae* D273-10B
2,6-diclorofenolindofenol (DCPI) 0,3 g/L
ditionato de sódio
droga A
etanol
extrato de levedura
p-fenilenodiamino (*p*-FDA) 2 g/L
ferricianeto 5,5 g/L
galactose
hipoclorito de sódio
metiltetrazólio (MTT) 10 g/L
óleo mineral
peptona
sorbitol 600 mM em tampão fosfato 50 mM pH 6,0
succinato 200 mM em tampão fosfato 50 mM pH 6,0
Triton X-100®

Materiais
banho de gelo
barras magnéticas
béqueres
cubetas para leitura
erlenmeyers
espátulas
papel alumínio
perolas de vidro
provetas
suportes para tubos de ensaio
tampões de algodão
tubos de centrífuga
tubos de ensaio
tubos Falcon

Aparelhagens
agitador magnético
autoclave
balança
banho fervente
centrífuga
espectrofotométrico
pHmetro
vórtice

Procedimento A – Preparo do meio, cultivo e separação das células

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Preparo do meio
1. Preparar 250 mL de meio de cultura para a cepa D273-10B de *S. cerevisiae*.
2. Seguir procedimento da *Prática 1 – Preparo de Meio de Cultura* com as seguintes alterações:
   a. meio de cultura: extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, galactose 20 g/L, pH 5,2;
   b. volume do erlenmeyer: 1 L.

Cultivo
3. Cultivar as células de maneira semelhante à *Prática 2 – Inoculação em Meio de Cultura*.

Separação de células
4. Separar as células quando atingirem densidade celular em torno de 4,5 mg/mL, em geral após 24 horas de crescimento.
5. Adicionar o meio contendo as células em tubos de centrífugas.
6. Centrifugar os meios a 1500X g por 10 min.
7. Descartar os sobrenadantes.
8. Ressuspender os precipitados adicionando 5 mL de água destilada **gelada**.
9. Unir as suspensões num único tubo de centrífuga.
10. Completar o volume para 50 mL com água destilada gelada.
11. Centrifugar novamente a 1500X g por 5 min.
12. Descartar o sobrenadante.
13. Repetir as etapas 10 a 12 mais uma vez.
14. Ressuspender o precipitado com sorbitol para obter uma densidade celular de 85 mg/mL.

Procedimento B – Fracionamento celular

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar 6 g de pérolas de vidro **geladas** em um tubo de centrífuga com tampa.
2. Adicionar no tubo de centrífuga 6 mL da suspensão de células (ver Procedimento A, etapa 14).
3. Manter o restante da suspensão de células em banho de gelo.
4. Agitar ininterruptamente em vórtice durante 1 min (*processo de lise*).
5. Resfriar em banho de gelo por 1 min (*processo de lise*).
6. Repetir as etapas 4 e 5 por mais 4 vezes.
7. Centrifugar a 1500X g por 5 min.
8. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para outro tudo de centrífuga com tampa.
9. Centrifugar o sobrenadante a 30.000X g por 25 min.
10. Descartar o sobrenadante.
11. Ressuspender o precipitado com 3 mL de sorbitol.
12. Manter a suspensão de mitocôndrias resultante em banho de gelo.

Procedimento C – Verificação da atividade da succinato desidrogenase

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Adicionar em cada tubo os volumes de suspensão de células estipulados na **Tabela 1**.
2. Manter os tubos 1, 2, 5 e 6 em banho de gelo.
3. Transferir os ***tubos 3, 4, 7 e 8*** para banho fervente.
4. Incubar os tubos 3, 4, 7 e 8 por 10 min.
5. Retirar as tubos 3, 4, 7 e 8 do banho fervente.
6. Transferir os tubos 3, 4, 7 e 8 para banho de gelo.
7. Adicionar em cada tubo os volumes de succinato, sorbitol e Triton X-100® estipulados na **Tabela 1**.
8. Homogeneizar em vórtice.
9. Adicionar em cada tubo os volumes de MTT e azul de metileno estipulados na **Tabela 1**.
10. Agitar levemente.
11. Cobrir todos os tubos com uma camada de 0,5 cm de espessura de óleo mineral.
12. Transferir ***todos*** os tubos do gelo para o banho de 30°C.
13. Incubar todos os tubos por 10 min.
14. Retirar todos os tubos do banho.
15. Observar os resultados.

Tabela 1

tubos	suspensão de células (mL)	succinato (mL)	sorbitol (mL)	Triton X-100® (mL)	MTT (mL)	azul de metileno (mL)	óleo mineral (cm)
1	0,25	0,50	1,25	-	0,10	-	0,50
2	0,25	0,50	1,15	0,10	0,10	-	0,50
3	0,25	0,50	1,25	-	0,10	-	0,50
4	0,25	0,50	1,15	0,10	0,10	-	0,50
5	0,25	0,50	1,25	-	-	0,10	0,50
6	0,25	0,50	1,15	0,10	-	0,10	0,50
7	0,25	0,50	1,25	-	-	0,10	0,50
8	0,25	0,50	1,15	0,10	-	0,10	0,50

Procedimento D – Verificação do funcionamento da cadeia respiratória de elétrons

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Procedimento geral para os tubos branco

1. Adicionar em cada tubo os volumes de tampão sorbitol e aceptores/doadores de elétrons estipulados na **Tabela 2**.
2. Homogeneizar em vórtice.
3. Cobrir todos os tubos com uma camada de 0,5 cm de espessura de óleo mineral.
4. Transferir todos os tubos para banho a 30°C.
5. Incubar por 10 min.
6. Retirar os tubos do banho.
7. Observar atentamente a coloração resultante.
8. Formular hipóteses sobre as colorações.

Tabela 2

tubos	ferricianeto (mL)	DCPI (mL)	p-FDA (mL)	sorbitol (mL)	óleo mineral (cm)
1	0,05	-	-	0,95	0,50
2	-	0,30	-	0,70	0,50
3	-	-	0,05	0,95	0,50

Procedimento geral para os tubos com suspensão de mitocôndrias

9. Adicionar em cada tubo os volumes de tampão sorbitol, succinato e suspensão de mitocôndrias estipulados na **Tabela 3**.
10. Homogeneizar em vórtice.
11. Adicionar em cada tubo os volumes de aceptores/doadores de elétrons estipulados na **Tabela 3**.
12. Homogeneizar em vórtice.
13. Cobrir todos os tubos com uma camada de 0,5 cm de espessura de óleo mineral.
14. Transferir todos os tubos para banho a 30°C.
15. Incubar por 10 min.
16. Retirar os tubos do banho.
17. Observar a ocorrência de mudança de coloração em relação aos tubos resultantes.
18. Formular hipóteses sobre as colorações.

Tabela 3

tubos	succinato 0,2 M (mL)	ferricianeto (mL)	DCPI (mL)	p-FDA (mL)	sorbitol (mL)	suspensão de mitocôndrias (mL)	óleo mineral (cm)
4	0,50	0,05	-	-	0,25	0,20	0,50
5	0,50	-	0,30	-	-	0,20	0,50
6	-	-	-	0,05	0,75	0,20	0,50

Procedimento geral para os tubos com suspensão de mitocôndrias e droga

19. Adicionar em cada tubo os volumes de tampão sorbitol, succinato e suspensão de mitocôndrias estipulados na **Tabela 4**.
20. Homogeneizar em vórtice.
21. Adicionar em cada tubo os volumes da droga e aceptores/doadores de elétrons estipulados na **Tabela 4**.
22. Homogeneizar em vórtice.
23. Cobrir todos os tubos com uma camada de 0,5 cm de espessura de óleo mineral.
24. Transferir todos os tubos para banho a 30°C.
25. Incubar por 10 min.
26. Retirar os tubos do banho.
27. Observar a ocorrência de mudança de coloração em relação aos tubos resultantes.
28. Formular hipóteses sobre as colorações.
29. ***Identificar o ponto de ação da droga A na cadeia respiratória de levedura.***

Tabela 4

tubos	succinato 0,2 M (mL)	droga A (mL)	ferricianeto (mL)	DCPI (mL)	p-FDA (mL)	sorbitol (mL)	suspensão de mitocôndrias (mL)	óleo mineral (cm)
7	0,50	0,10	0,05	-	-	0,15	0,20	0,50
8	0,50	0,10	-	0,30	-	-	0,10	0,50
9	-	0,10	-	-	0,05	0,75	0,10	0,50

Tabelas

O funcionamento da cadeia de transporte mitocondrial será verificado com o uso de aceptores e doadores artificiais de elétrons. A escolha daqueles a serem utilizados deve ser feita consultando as tabelas que se seguem. Os aceptores e doadores são fornecidos na forma oxidada, com exceção do TMPD.

Tabela 5

	PARES REDOX	E_0'	REDUZIDO	OXIDADO
ACEPTORES E DOADORES ARTIFICIAIS	metil tetrazólio (MTT) red/ox	-0,12	roxo	amarelo
	azul de metileno red/ox	0,10	incolor	azul
	2,6-diclorofenolindofenol (DCPI) red/ox	0,20	incolor	azul
	p-fenilenodiamino (p-FDA) red/ox	0,36	amarelo	violeta escuro
	ferricianeto $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$	0,36	incolor	amarelo

COMPONENTES DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS	NADH / NAD^+	-0,32
	succinato / fumarato	0,03
	$FADH_2$ / FAD	0,05
	cit b (Fe^{2+}) / cit b (Fe^{3+})	0,06
	cit c_1 (Fe^{2+}) / cit c_1 (Fe^{3+})	0,22
	cit c (Fe^{2+}) / cit c (Fe^{3+})	0,25
	cit a-a_3 (Fe^{2+}) / cit a-a_3 (Fe^{3+})	0,40
	H_2O / 1/2 O_2	0,82

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 7

PRÁTICA 16 - SEQÜENCIAMENTO DE PROTEÍNAS – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA
PRÁTICA 17 - MEMBRANAS – COMPARTIMENTALIZAÇÃO DE AZUL DE METILENO EM VESÍCULAS UNILAMELARES DE FOSFATIDILCOLINA
PRÁTICA 18 - CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS – DETERMINAÇÃO DO PONTO DE AÇÃO DE DROGAS

1. Na *Prática 16*, qual seria o resultado da cromatografia realizada se o metanol for retirado da fase móvel? Explique.
2. Na *Prática 16*, retirando-se o ácido acético observou-se que todos os aminoácidos formavam manchas alongadas. A que se deve este efeito?
3. Na *Prática 16*, sabendo que a massa molar do peptídeo desconhecido é 294 g/mol, determinar a seqüência mais provável do peptídeo.
4. Na *Prática 17*, explicar o perfil de eluição cromatográfico obtido.
5. Na *Prática 17*, calcular a % de incorporação de azul de metileno nas vesículas.
6. Na *Prática 17*, as vesículas são preparadas em NaCl 100 mM e eluídas na coluna de Sephadex com a mesma solução. O que aconteceria com as vesículas se estas fossem eluídas com NaCl 10 mM. E se fosse eluídas com NaCl 1M?
7. Na *Prática 18* utilizou-se galactose como fonte de carbono para o crescimento das leveduras. Há alguma justificativa para essa escolha?
8. Na *Prática 18* a droga A inibe qual complexo? Como se justificaria essa resposta?

Planejamento 9

PRÁTICA 19 - REGULAÇÃO DO METABOLISMO – SINAL DE GLICOSE E ATIVAÇÃO DA TREALASE
Discussão da Prática 19

1. Em uma levedura selvagem, qual das vias metabólicas, síntese ou degradação de trealose, deverá estar ativada nas situações propostas abaixo:
    a. Ausência de glicose;
    b. Presença de glicose.

    Justificar as respostas.
2. Em termos relativos, em qual das situações acima a atividade de trealase deverá ser maior?
3. Quais os objetivos dos procedimentos A, B, C, D e E?
4. Segundo descrito no protocolo, cada uma das cepas (50 mg) será submetida a dois tratamentos:
    a. Quais são esses tratamentos?
    b. Qual o objetivo desses tratamentos?
5. Qual a função do PMSF e pérolas de vidro no procedimento C?
6. Qual método será utilizado para detecção da proteína total presente nas amostras?
7. Como será detectada e quantificada (U/mL) a atividade de trealase ?
8. Por que é necessário determinar a concentração de proteína total (mg/mL) em todas as amostras ? Justificar.

Prática 19
Regulação do metabolismo – sinal de glicose e ativação da trealase

Objetivo
Estudar o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Determinar a atividade trealásica de três cepas de leveduras em resposta a um sinal de glicose.

Reagentes
ácido clorídrico
água destilada
cepa *S. cerevisiae* 131
cepa *S. cerevisiae* AM9-8B
cepa *S. cerevisiae* S288-C
colato de sódio 40 g/L
extrato de levedura
fluoreto de α-toluenosulfonila (PMSF) 100 mM em etanol
glicose 100 mM em tampão maleato de sódio 50 mM pH 6,0
glicose 1mM
hidróxido de sódio 100 g/L
β-mercapto-etanol
peptona
reagente enzimático (glicose oxidase e peroxidase)
sulfato de cobre pentahidratado 10 g/L
tampão fosfato 50 mM pH 6,2 com EDTA 0,6 mM, PMSF 0,5 mM e β-mercaptoetanol 0,5 mM)*
tampão maleato de sódio 50 mM pH 6,0
trealose 100 mM em tampão maleato de sódio 50 mM pH 6,0

Materiais
banho de gelo
barras magnéticas
béqueres
cubetas para leitura
erlenmeyers
espátulas
pérolas de vidro
pipetadores
pipetas
ponteiras
provetas
suporte para tubos de ensaio
tampões de algodão
tubos de centrífuga
tubos de ensaio
tubos Eppendorf

Aparelhagens
agitador magnético
autoclave
banho 30°C
banho fervente
centrífuga
espectrofotômetro
pHmetro
vórtice

* O PMSF e o β-mercapto-etanol são adicionados no tampão fosfato no dia em que o tampão será usado.

IMPORTANTE
ELABORAR PROTOCOLOS DETALHADOS DE TODOS OS PROCEDIMENTOS E DISCUTÍ-LOS COM OS PROFESSORES E MONITORES ANTES DE INICIAR OS EXPERIMENTOS.

PROCEDIMENTO GERAL
SINAL DE GLICOSE E ATIVAÇÃO DA TREALASE

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. **Cultivar três diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e separá-las como descrito no *PROCEDIMENTO A*.**
2. **Proceder ao sinal de glicose como descrito no *PROCEDIMENTO B*.**
3. **Preparar o homogeneizado de células como descrito no *PROCEDIMENTO C*.**
4. **Dosar proteínas nos extratos como descrito no *PROCEDIMENTO D*.**
5. **Determinar a atividade trealásica como descrito no *PROCEDIMENTO E*.**

Procedimento A – preparo do meio, cultivo e separação das células

Preparo do meio

1. Preparar 200 mL de meio de cultura para cada cepa de *S. cerevisiae*.
2. Seguir procedimento da *Prática 1 – Preparo de Meio de Cultura* com as seguintes alterações:
   a. meio de cultura: extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L, pH 5,2;
   b. volume do erlenmeyer: 1 L

Cultivo

3. Cultivar as células de maneira semelhante à *Prática 2 – Inoculação no Meio de Cultura.*

Separação de células

4. Separar as células quando atingir densidade celular maior que 2,5 mg/mL.
5. Remover da suspensão de células um volume que contenha 50 mg de células (peso seco).
6. Colocar o meio contendo as células em tubo de centrífuga.
7. Centrifugar o meio a 1500X *g* por 10 min.
8. Descartar o sobrenadante.
9. Ressuspender o precipitado em água destilada gelada para um volume final de 20 mL.
10. Centrifugar o meio novamente a 1500X *g* por 10 min.
11. Descartar o sobrenadante.
12. Repetir as etapas 9 a 11 mais uma vez.

Procedimento B – Sinal de glicose

1. Para cada cepa adicionar em cada tubo as quantidades de células e soluções estipulados na **Tabela 1**.
2. Homogeneizar em vórtice.
3. Transferir os tubos ao mesmo tempo para um banho a 30°C.
4. Incubar os tubos por 10 min.
5. Transferir os tubos para banho de gelo imediatamente após o término da incubação.
6. Transferir a suspensão para tubos de centrífuga com tampa.
7. Centrifugar as células a 1500X *g* por 5 min.
8. Descartar o sobrenadante.

Tabela 1

tubos	massa de células (mg)	tampão maleato (mL)	glicose 100 mM em tampão maleato (mL)
1	50,0	5,0	-
2	50,0	-	5,0

Procedimento C – Preparo do homogeneizado

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Em um tubo de centrífuga com tampa adicionar o precipitado de células (ver Procedimento B).
2. Adicionar 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,2 com EDTA 0,6 mM, PMSF 0,5 mM e β-mercapto-etanol 0,5 mM.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Adicionar à suspensão 1 g de pérolas de vidro ***geladas***.
5. Manter os tubos em banho de gelo.
6. Agitar *ininterruptamente* em vórtice durante 1 min (*processo de lise*).
7. Resfriar em banho de gelo por 1 min (*processo de lise*).
8. Repetir as operações 6 e 7 por mais 2 vezes.
9. Introduzir a ponta da ponteira plástica do pipetador de 1 mL no fundo do tubo.
10. Aspirar lentamente, removendo 1 mL de homogenato, ***sem remover as pérolas de vidro***.
11. Dispensar todo o homogenato em tubo Eppendorf gelado.
12. Centrifugar em micro-centrífuga a 20.000X *g* por 5 min.
13. Transferir todo o sobrenadante cuidadosamente para outro tubo Eppendorf.
14. Manter os extratos livres de células em banho de gelo.

Procedimento D – Dosagem de proteína (mini-biureto)

Especificações para montagem das tabelas de curva padrão e de dosagem de proteínas

1. Solução padrão de proteína: albumina 10 g/L.
2. Fazer uma curva padrão contendo ao menos 4 pontos no intervalo de 0,5 mg a 2,5 mg de proteína.
3. A amostra de proteína a ser dosada (solução padrão e amostras) deve estar contida em volume máximo de 0,5 mL. Se o volume da amostra for menor, completar com água destilada até 0,5 mL.
4. Fazer pelo menos três concentrações diferentes para a dosagem de proteínas na amostra.
5. As amostras de proteínas são os extratos livres de células provenientes do ***PROCEDIMENTO B***.
6. As tabelas deverão conter todas as substâncias utilizadas nos procedimentos.

Procedimento

1. Adicionar em cada tubo os volumes requeridos de padrão de proteína, amostras e água.
2. Adicionar em todos os tubos 200 µL de colato de sódio.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Adicionar 2 mL de hidróxido de sódio.
5. Adicionar 300 µL de sulfato de cobre
6. Homogeneizar em vórtice.
7. Repousar por 10 min em temperatura ambiente.
8. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
9. Ler as absorbâncias a 540 nm.

Procedimento E – Ensaio da atividade trealásica – Dosagem de glicose

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Ensaio da atividade trealásica

1. Adicionar em cada tubo de ensaio 100 µL do extrato livre de células.
2. Adicionar em cada tubo de ensaio 100 µL de trealose 100 mM em tampão maleato de sódio 50 mM pH 6,0. **Os tubos devem ser preparados em banho de gelo.**
3. Transferir todos os tubos do gelo para um banho a 30°C
4. Incubar todos os tubos por 15 min.
5. Interromper a reação colocando todos os tubos em banho fervente.
6. Incubar todos os tubos por 3 min.
7. Remover todos os tubos do banho fervente.
8. Resfriá-los em banho de gelo.
9. Dosar a glicose formada.

Especificações para montagem das tabelas de curva padrão e de dosagem de glicose

A glicose formada pela ação da trealase sobre a trealose será determinada pelo método enzimático (glicose oxidase + peroxidase).

1. Concentração da solução padrão de glicose: 1 mM.
2. Fazer a curva padrão deste ensaio com um mínimo de 4 pontos no intervalo de 20 a 150 nmols de glicose.
3. A amostra de glicose a ser dosada (solução padrão e amostras) deve estar contida em volume máximo de 200 µL. Se o volume da amostra for menor, completar com água destilada até 200 µL.
4. Fazer pelo menos três concentrações diferentes para a dosagem de glicose na amostra.
5. As amostras de glicose são provenientes do ***Ensaio da atividade trealásica*** (*Procedimento D*).
6. As tabelas deverão conter todas as substâncias utilizadas nos procedimentos.

Procedimento

1. Adicionar em cada tubo os volumes requeridos de padrão de glicose, amostras e água.
2. Adicionar em todos os tubos 2 mL de reagente enzimático.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Transferir todos os tubos para banho a 30°C.
5. Incubar todos os tubos por 30 min.
6. Remover todos os tubos do banho.
7. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
8. Ler as absorbâncias a 510 nm.

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados 8

PRÁTICA 19 - REGULAÇÃO DO METABOLISMO – SINAL DE GLICOSE E ATIVAÇÃO DA TREALASE

Instruções:

1. **Construir a curva padrão de proteína pelo método de Biureto.**
2. **Calcular a concentração de proteínas nos extratos de cada cepa.**
3. **Construir a curva padrão de glicose pelo método enzimático (glicose oxidade + peroxidase).**
4. **Calcular a concentração de glicose nos extratos de cada cepa.**
5. **Calcular a atividade da trealase (U/mL) em cada cepa.**
6. **Calcular a atividade específica da trealase (U/mg proteína) em cada cepa.**
7. **Indicar qual cepa (S288-C, 131 e AM9-8B) tem atividade trealásica:**
    a. **normal (trealase responsiva);**
    b. **alta (trealase sempre ativada);**
    c. **baixa (trealase sempre desativada).**
8. **Explicar os resultados apontando os genes afetados nas diferentes cepas.**

Prática 20
Tecnologia de Panificação

Introdução
O pão é um dos alimentos fermentados mais antigos que se conhece. A *challah* é um pão preparado há muitos séculos pelos judeus para comemorar o sábado, o dia do descanso. *Challah* é o nome bíblico da taxa imposta pela divindade a ser paga em espécie. Assim quando alguém assa mais do que uma certa quantidade de pão, uma parcela específica deste pão devia ser doada a um sacerdote.
O ritual secular da comemoração do sábado inclui a degustação deste pão preparado para esta ocasião festiva e, portanto, um pão de rico sabor.
A receita abaixo é muito antiga e, como foi preservada por tradição oral, não se tem a idéia exata de há quantos séculos ela existe.

Receita da massa do pão
80 g de sacarose (4 colheres de sopa de açúcar)
60 g de *S.* cerevisiae (4 tabletes de fermento)
500 mL de água a cerca de 40°C (2 ½ xícaras de água morna)
1 kg de farinha de trigo
3 colheres de chá de sal (15 g de NaCl)
3 ovos ligeiramente batidos
100 mL de óleo vegetal (5 colheres de sopa)

Materiais
tigela funda para sovar
assadeira retangular

Aparelhagens
forno (estufa)

Procedimentos
Cada grupo principal (A, B, C, D, E, F, G e H) deverá trazer para o laboratório uma tigela funda para sovar a massa, com um diâmetro aproximado de 35 cm e profundidade de 25 cm.
Cada sub-grupo deverá trazer para o laboratório uma assadeira retangular de cerca de 30 cm de comprimento.
Cada grupo principal (A, B, C, D, E, F, G e H) vai preparar uma receita de massa.
Ao final, cada sub-grupo vai assar o seu pão (X1, X2, X3).

Preparação da massa
1. Colocar 20 g de sacarose em um béquer de 500 mL com 150 mL de água morna.
2. Dissolver os tabletes de fermento.
3. Adicionar à suspensão cerca de 100 g de farinha.
4. Misturar bem.
5. Aguardar o aumento de volume da mistura e a formação de bolhas de gás.
6. Colocar na tigela funda o restante da farinha e do açúcar.
7. Adicionar, mexendo bem com as mãos, o restante da água na qual o sal tenha sido previamente dissolvido.
8. Adicionar então os ovos batidos e o óleo.
9. Misturar até obter uma massa lisa e homogênea.
10. Quando a massa dobrar seu volume, colocá-ia na tigela.
11. Misturar fortemente, sovando a massa, durante 10-15 minutos até a massa ficar lisa, elástica, cheia de bolhas e não grudar nos dedos.
12. Fazer uma bola de massa.
13. Pingar sobre a bola algumas gotas de óleo para lubrificar a superfície.
14. Deixar na tigela para crescer até o dobro do volume. As tigelas podem ser colocadas em uma estufa a 30 °C.
15. Afundar a massa com as mãos quando esta dobrar de tamanho, o que leva cerca de uma hora.
16. Sovar novamente por outros 10-15 minutos.
17. Fazer nova bola de massa.
18. Lubrificar a massa com algumas gotas de óleo.
19. Deixar a massa crescer a 30°C para dobrar de novo de volume.
20. Afundar a massa novamente ao fim do segundo crescimento.
21. Moldar a massa em um cilindro.
22. Dividir a massa em 3 partes iguais.

Cada sub-grupo deverá trabalhar com uma parte da massa.

Preparação da trança

23. Subdividir o pedaço de massa recebido em 3 partes.
24. Moldar cada uma elas como um cilindro de 30 cm de comprimento por 3-4 cm de diâmetro.
25. Colocar as três tiras de massa em paralelo na assadeira.
26. Trançá-las passando uma tira sobre a outra.
27. Pressionar unidas as pontas da massa.
28. Fazer uma mistura feita com 1 ovo batido, 100 mL de água e 50 g de sacarose.
29. Pincelar a trança formada com a mistura.
30. Colocar a assadeira na estufa a 30°C.
31. Deixar a massa crescer até a trança dobrar ou triplicar seu volume.
32. Coloque a massa para assar na estufa regulada para 180°C (forno médio).
33. Deixar assar por cerca de 30 minutos, até que fique bem dourada.
34. Verificar se o pão está bem assado enfiando a lâmina de uma espátula de aço ou de uma faca no pão. A lâmina deve sair seca.

Questões para Discussão

1. Porque a massa mole de farinha e levedo forma bolhas?
2. As bolhas são formadas de que gás?
3. Já que a levedura *S. cerevisiae* não expressa a enzima amilase, que substratos usa para o seu metabolismo na massa de pão?
4. Porque a massa é sovada e deixada crescer?
5. Porque o pão não tem gosto de álcool?