Práticas em BIOLOGIA CELULAR

Profa. Karina Mancini

Campus São Mateus
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

APRESENTAÇÃO

Prezado aluno,

Este caderno foi elaborado especialmente para VOCÊ, aluno da disciplina de BIOLOGIA CELULAR, pois apresenta todas as atividades laboratoriais que compõem a disciplina e deve estar com você em todas as aulas práticas. Nele, você acompanha os procedimentos de cada aula de laboratório, podendo anotar resultados alcançados e esperados, responder às questões formuladas e esquematizar as imagens visualizadas ao microscópio. Ainda, ele apresenta um breve e agradável histórico da microscopia, noções do funcionamento do microscópio e da formação de imagem, além das principais técnicas aplicadas.

Por descrever todos os passos para uma focalização correta e eficiente, deve estar ao seu lado em todos os momentos em que for manusear um microscópio.

Seja bem vindo ao mundo da BIOLOGIA CELULAR e da microscopia,

Profa. Karina Mancini
Dezembro/2015

Fonte da imagem da capa: http://encantosdaciencias.blogspot.com.br/2013/05/resumao-do-7s.html

SUMÁRIO

CAPÍTULO 01
FALANDO UM POUCO DE HISTÓRIA 4

CAPÍTULO 02
COMPREENDENDO AS PROPRIEDADES ÓPTICAS DO MICROSCÓPIO 6

CAPÍTULO 03
DESCREVENDO OS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ 8

CAPÍTULO 04
OBEDECENDO AS REGRAS DE USO DO LABORATÓRIO DE MICROSCOPIA 10

CAPÍTULO 05
DESCOBRINDO O MICROSCÓPIO DE LUZ 11

CAPÍTULO 06
CONHECENDO OS COMPONENTES QUÍMICOS DAS CÉLULAS 20

CAPÍTULO 07
BRINCANDO COM AS MEMBRANAS CELULARES 23

CAPÍTULO 08
ENTRANDO NO NÚCLEO CELULAR 27

CAPÍTULO 09
REPRESENTANDO A SÍNTESE PROTEICA 29

CAPÍTULO 10
ENTENDENDO OS CLOROPLASTOS 31

CAPÍTULO 11
DESVENDANDO A MATRIZ EXTRACELULAR 33

CAPÍTULO 12
MEXENDO O CITOESQUELETO 35

CAPÍTULO 13
ACOMPANHANDO A DIVISÃO CELULAR 38

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA 42

CAPÍTULO 01

FALANDO UM POUCO DE HISTÓRIA

A história da microscopia data de 721 a.C, por relatos de cristal de rocha recortado com propriedades de ampliação. Entretanto, o primeiro microscópio tem origem por dois fabricantes de óculos, os holandeses Hans Jansen e Zacharias Jansen (pai e filho), por volta de 1595. Inicialmente, esses microscópios foram construídos exclusivamente para a nobreza europeia, pois se tratava de um brinquedo que possibilitava a observação de pequenos objetos. Para a comunidade científica, o aumento final, cerca de 10x, devido a presença de uma única lente de vidro, não permitia a identificação de materiais com precisão e por isso o microscópio permaneceu nas mãos da nobreza como diversão.

A partir da segunda metade do século XVII, os microscópios começaram a ganhar a comunidade científica, adquirindo estruturas mais estáveis com um tripé de sustentação. Esses microscópios eram produzidos principalmente na Inglaterra e Itália a partir de madeira, metal, papelão ou couro, e lente de vidro. A primeira observação de materiais biológicos com fins científicos foi feita, em meados de 1680, pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek, que identificou espermatozoides de animais e glóbulos vermelhos de humanos, ainda com microscópios simples de uma única lente.

Dado o crescimento no interesse pela microscopia, no século seguinte houve uma considerável melhoria nas lentes, além do surgimento de modelos cada vez mais elaborados, com combinações e articulações, tornando o instrumento mais estável, com aumento de ampliação, menores aberrações e maior precisão de foco. O precursor desses modelos elaborados foi o inglês Robert Hooke, que, graças à combinação de duas lentes, construiu um microscópio composto que permitiu a observação, e descobrimento, da célula. Sua publicação, em 1665, descreve a visualização em um fino fragmento de cortiça (da casca de certas árvores) de pequenas caixas microscópicas aparentemente vazias, as quais denominou *cell* (cavidade ou cela em inglês).

Com a diversidade de modelos, em meados de 1750, a popularização dos microscópios ganhou até espaços públicos com espetáculos de projeção. Nos dois séculos seguintes, os microscópios se tornaram cada vez mais elaborados e precisos, conquistando espaço indispensável nas mais diversas áreas da ciência, desde escolas até grandes centros de referência mundial.

Graças aos avanços na microscopia, em 1833, o botânico escocês Robert Brown observou que a maioria das células (*cell*) tinha uma estrutura interna esférica, a qual denominou de núcleo. Em 1838, o botânico alemão Mathias Schleiden afirmou que todas as plantas eram constituídas por células. Da mesma forma, um ano depois, o zoólogo alemão Theodor Schwann, corroborou a descoberta de Mathias Schleiden nos animais. Essas duas importantes observações fundamentaram a Teoria Celular, na qual "todo ser vivo é constituído por células".

Foi somente na década de 30, que surgiu o microscópio eletrônico (que utiliza elétrons e lentes magnéticas ao invés de fótons e lentes de vidro, como em todos os modelos descritos), criado pelos alemães Ernst Ruska e Max Knoll. Hoje, esses microscópios eletrônicos ampliam o material até cerca de 500.000 vezes, sendo possível assim a visualização de organelas e outras estruturas subcelulares.

CAPÍTULO 02

COMPREENDENDO AS PROPRIEDADES ÓPTICAS DO MICROSCÓPIO

A luz difusa, proveniente da fonte luminosa, é capturada pela lente condensadora, abaixo da plantinha, e concentrada sob o material biológico na lâmina. Para que a luz ultrapasse a lâmina de vidro e o material, e ainda alcance as lentes objetivas, a amostra precisa ser fina. Uma vez a luz ultrapasse a amostra, a imagem chega às lentes objetivas, sendo real, invertida e ampliada, conforme a lente usada (4x, 10x, 40x ou 100x). Finalmente, a imagem passa pelo canhão até às oculares, onde novamente é ampliada. Essa segunda imagem é virtual, fruto da primeira proveniente das objetivas.

O ***Aumento Final*** de um material no microscópio de luz é calculado multiplicando-se o aumento das lentes utilizadas, a ocular e a objetiva, uma vez que a lente condensadora não tem poder de ampliação. Se o microscópio possuir uma ocular de 10x e a objetiva de uso for de 40x, o aumento final do material será 10x40. Portanto, a imagem visualizada está 400x ampliada.

A ampliação de um microscópio é o coração da observação. Porém, um bom microscópio não é aquele que permite grandes aumentos, e sim aquele que reproduz com qualidade os detalhes do material. Neste contexto, dois conceitos são muito importantes: Poder de Resolução e Limite de Resolução.

Poder de Resolução é a capacidade que um microscópio possui de formar imagens distintas entre dois pontos muito próximos. Quanto maior o Poder de Resolução, melhor será o equipamento.

Já o ***Limite de Resolução*** é a menor distância entre dois pontos que forma imagens distintas. Essa distância é determinada pela equação:

$$LR = 0{,}612 x \gamma / AN, \text{ onde:}$$

0,612 = constante

γ = comprimento de onda da fonte luminosa (geralmente luz branca = 0,55µm)

AN = abertura numérica da lente objetiva (informada na própria lente)

Esses dois conceitos são inversamente proporcionais. Quanto maior o Limite de Resolução, menor será o Poder de Resolução.

Para melhor entendimento, vale a pena comparar duas lentes objetivas (4x e 40x) de um microscópio hipotético.

LR (lente 4x) = 0,612x0,55/0,1 LR = 3,36µm

LR (lente 40x) = 0,612x0,55/0,65 LR = 0,51µm

Assim, para a lente objetiva 4x, 3,36µm (LR alto) é a menor distância entre dois pontos que forma imagens distintas, enquanto para a objetiva de 40x essa distância é de apenas 0,51µm (LR baixo). Já a lente objetiva 40x tem a capacidade de distinguir dois pontos muito mais próximos que a lente de 4x, possuindo assim maior Poder de Resolução.

Em geral, o máximo de Poder de Resolução de um microscópio de luz está em torno de 0,2µm (usando a lente de 100x). Essa informação é essencial para a determinação da estrutura que pode ser observada e identificada neste instrumento óptico (Figura 1).

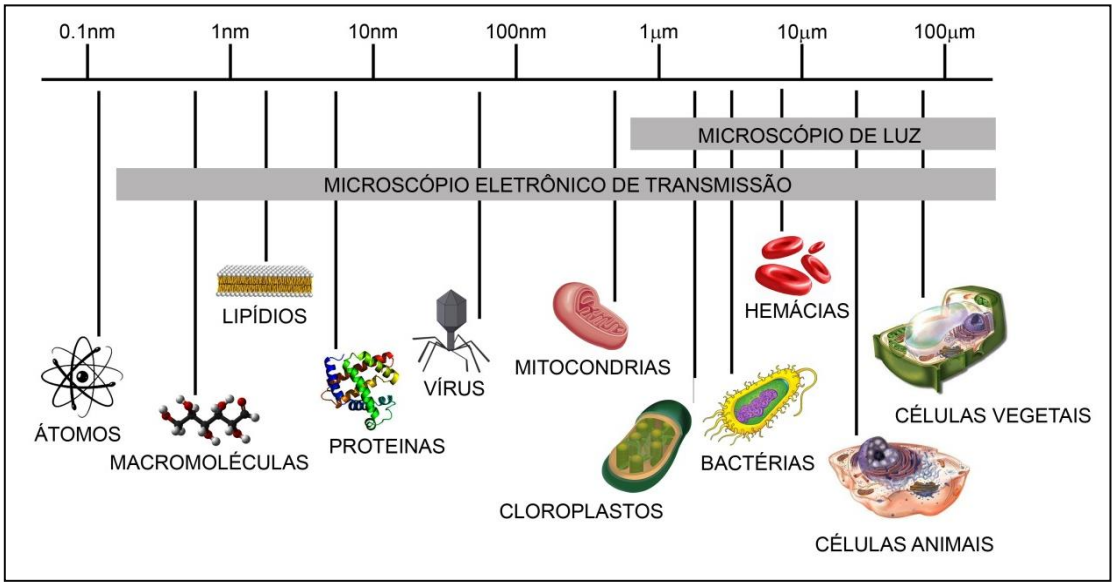


Figura 1: Dimensões de células e estruturas biológicas

CAPÍTULO 03

DESCREVENDO OS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

A observação ao microscópio de luz requer, na grande maioria das vezes, um preparo prévio da amostra. Basicamente, existem dois tipos de preparações, as temporárias, para análise imediata do material, e as permanentes, para serem analisadas muitas vezes e podem ser armazenadas por anos.

O importante em todas as preparações é que o material biológico tenha pequena dimensão e densidade, permitindo que o feixe de fóton atravesse a amostra para formação da imagem. Outro procedimento importante é o uso de soluções líquidas nos materiais. Esses líquidos abrangem água destilada, água doce, água salgada, soro sanguíneo, soro fisiológico, solução salina, corantes e muitos outros. Em especial os corantes melhoram significativamente a visualização do material por criar diferente índices de refração na amostra.

As principais técnicas para observação em microscopia são:

Preparação a fresco: utilizada para observar células vivas. É a preparação mais simples. O material biológico é colocado sobre uma lâmina de vidro em meio específico para manutenção celular e coberto com uma lamínula. Ex: suspensão de grão de pólen, suspensão de micro-organismos, pequenas estruturas foliares, sêmen.

Coloração vital: técnica semelhante à preparação a fresco, porém com a utilização de um corante que penetra na célula sem alterar sua fisiologia.

Esfregaço: utilizada para observação de células espalhadas em meio líquido. A suspensão celular é colocada em uma extremidade da lâmina de vidro e uma outra lâmina, com 45º de inclinação, arrasta o material por toda a superfície de vidro. A lâmina é colocada em contato com uma solução fixadora e depois corada. Ex: sangue.

Espalhamento: utilizada para observação de células extraídas de seus tecidos de origem. O material é raspado (espátula ou palito), colocado em solução sobre lâmina de vidro e coberto com uma lamínula. Ex: mucosa bucal, anal ou vaginal.

Esmagamento: utilizada para observação de tecidos de baixa resistência. O material é colocado no centro da lâmina de vidro, coberto com uma lamínula e pressionado com o dedo ou objeto não pontiagudo. O material pode ou não ser corado antes do esmagamento. Ex: tecidos moles (fígado, baço, rim, timo), partes reprodutivas de plantas, estudo de divisão celular.

Decalque: utilizada para observação de núcleos de tecidos moles. Um fragmento de tecido é pressionado várias vezes sobre uma lâmina, como um carimbo, e seus núcleos, por diferença densidade, ficam impressos na lâmina. Após a impressão, o material é corado. Ex. estudo nucleares de tecidos moldes (fígado, baço, rim, timo).

Corte histológico: utilizada para observação da grande maioria dos tecidos sem alteração de sua organização. É a preparação mais complexa e composta por várias etapas: Fixação, Desidratação, Inclusão em parafina, Corte em micrótomo, Montagem em lâmina, Hidratação e Coloração.

CAPÍTULO 04

OBEDECENDO AS REGRAS DE USO DO LABORATÓRIO DE MICROSCOPIA

1. Não são permitidos ALIMENTOS e BEBIDAS dentro do laboratório;
2. É obrigatório o uso de JALECO em todas as aulas práticas;
3. O aluno que não estiver de jaleco NÃO PODERÁ ASSISTIR a aula prática;
4. NÃO SERÃO EMPRESTADOS jalecos de professor e monitor do laboratório que eventualmente não estejam sendo usados;
5. MOCHILAS, PASTAS, BOLSAS não devem ser colocadas sobre a bancada. Mantenha somente estojo e esta apostila;
6. Os microscópios devem ser mantidos nas POSIÇÕES ORIGINAIS;
7. Pede-se cuidado no MANUSEIO das lâminas histológicas, principalmente àquelas de preparo permanente (a quebra de uma lâmina histológica permanente acarretará em PENALIDADE para o aluno);
8. As lâminas de PREPARAÇÃO A FRESCO devem ser DESCARTADAS em recipientes identificados sobre a bancada. Já as lâminas PERMANENTES devem ser DEVOLVIDAS às bandejas de origem.
9. A OBJETIVA DE 100x (anel branco), ou objetiva de imersão, poderá ser usada quando solicitada pelo professor, caso contrário, usam-se somente as objetivas de 4x até 40x.
10. Após o uso da OBJETIVA DE 100x devem-se seguir rigorosamente os procedimentos de limpeza, ou seja, lenço de papel (ou algodão ou cotonete) levemente umedecido em solução de ÉTER/ÁLCOOL, na proporção de 2:1;
11. Ao final de cada aula prática, o REVÓLVER DOS MICROSCÓPIOS deve obrigatoriamente estar posicionado na objetiva panorâmica (4x). Diminua a intensidade de luz até DESLIGAR A LÂMPADA. Verifique se não foi esquecida LÂMINA NO MICROSCÓPIO (ou sobre a bancada).

CAPÍTULO 05

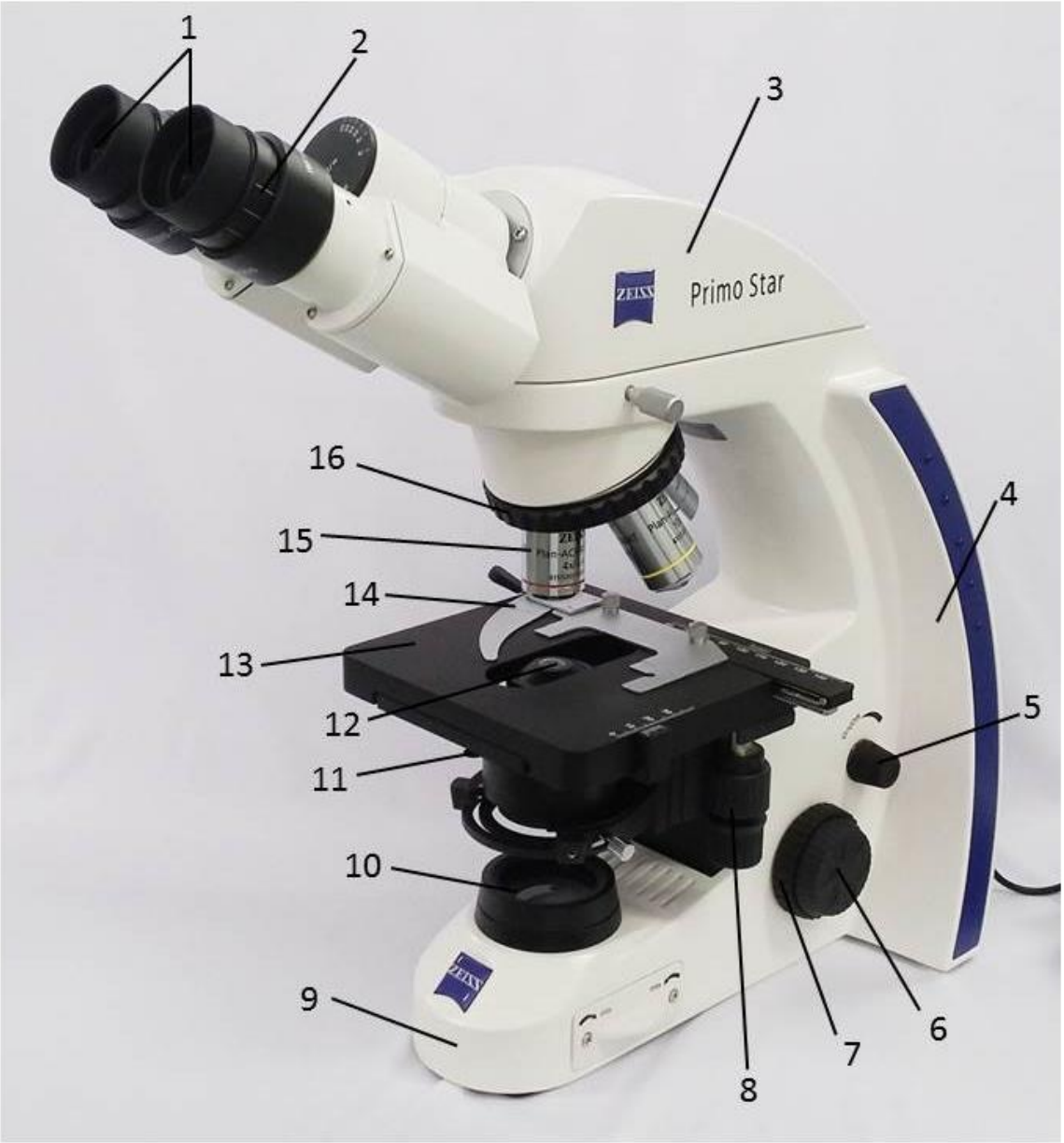
DESCOBRINDO O MICROSCÓPIO DE LUZ

A microscopia é a principal ferramenta da Biologia Celular, uma vez que o olho humano é incapaz de visualizar uma célula e muito menos identificar suas estruturas/organelas. Assim, é através do microscópio que reconhecemos as células e seus constituintes. Existem diversos tipos de microscopia (luz e eletrônica) que utilizam diferentes sistemas de alimentação (fóton e elétron) e, portanto, apresentam aumentos que vão desde 1000x à 1.000.000x.

O microscópio de luz é, sem dúvida, o mais utilizado em práticas de Biologia Celular, tanto no ensino médio quanto no ensino superior. Cada uma de suas objetivas proporciona um dimensionamento diferenciado (calculado pela multiplicação dos aumentos da objetiva e da ocular). Cada objetiva tem ainda seu Limite de Resolução, que refere-se à menor distância que pode existir entre dois pontos distinguíveis. O olho humano tem um Limite de resolução de aproximadamente 0,2mm, enquanto no microscópio de luz, esse Limite é de 0,25µm. Desta forma, o presente capítulo tem por objetivos demonstrar (1) as partes constituintes do microscópio de luz e suas funções; (2) os passos para uma correta observação; (3) a inversão de imagem; (4) limite de resolução; (5) profundidade de foco.

1. **Partes do Microscópio de Luz**

   Observe a figura abaixo e indique o nome das estruturas constituintes de um microscópio de luz e suas respectivas funções:



1. _____

Função: _____

2. _____

Função: _____

3. _____

Função: _____

4. _____

Função: _____

5. _____

Função: _____

6. _____

Função: _____

7. _____

Função: _____

8. _____

Função: _____

9. _____

Função: _____

10. _____

Função: _____

11. _____

Função: _____

12. _____

Função: _____

13. _____

Função: _____

14. _____

Função: _____

15. _____

Função: _____

16. _____

Função: _____

2. Procedimentos de Focalização

Siga as instruções abaixo todas as vezes que utilizar um microscópio de luz. Esses são os procedimentos corretos de manuseio, iluminação e observação.

1. Tire a capa plástica e verifique se o microscópio está ligado na tomada com voltagem adequada;
2. Ligue a fonte de luz e ajuste sua intensidade à metade;
3. Verifique se o revólver está posicionado para observação com a lente objetiva panorâmica (4x). Caso não esteja, gire cuidadosamente o revólver até essa posição;
4. Coloque uma lâmina histológica sobre a platina, prendendo cuidadosamente com a presilha. Lembre-se de posicionar a lamínula sempre para cima;
5. Posicione o material a ser observado sobre o orifício da platina sobre a lente condensadora, utilizando o botão *charriot*;
6. Observando por ambas as lentes oculares, e com a objetiva panorâmica, focalize o material da lâmina girando o botão macrométrico e depois refine o foco girando o micrométrico;
7. Com os olhos ainda próximos às lentes oculares, ajuste-as para melhor visualização, modificando a distância entre elas e girando-as para aumentar a nitidez. Lembre-se que esses ajustes variam de pessoa para pessoa;
8. Ajuste a abertura do diafragma da lente condensadora, abaixo da platina, e a intensidade de luz, para tornar a iluminação suave e agradável aos seus olhos. Lembre-se que cada material requer uma iluminação diferente e que esses ajustes variam de pessoa para pessoa;
9. Desloque a lâmina, com o auxílio do *charriot*, para examinar todo o material;
10. Havendo necessidade de aumento, gire cuidadosamente o revólver para a próxima objetiva (10x) e use somente o botão micrométrico para ajuste de foco. Repita o mesmo procedimento para a lente objetiva de 40x;
11. A lente objetiva de 100x (anel branco) deve ser usada somente quando solicitada pelo professor e sempre com uma gota de óleo de imersão entre a lente e a lamínula;
12. Ao final da observação desta lâmina, abaixe a platina com o botão macrométrico, gire o revólver até a posição de visualização com a objetiva panorâmica, desprenda a lâmina da presilha e deslize-a sobre a platina;
13. Guarde a lâmina em lugar seguro (se permanente) ou descarte em local apropriado (se preparação a fresco).
14. Para nova observação, repita todos os procedimentos descritos.

ERROS MAIS COMUNS COMETIDOS NO MANUSEIO DO MICROSCÓPIO

1. **Colocar a lâmina na platina com a lamínula para baixo.**

   Por isso verifique sempre o lado da lamínula.

2. **Usar óculos no microscópio.**

   Não chega a ser um erro, mas não precisa, pois as lentes oculares fazem as correções da visão.

3. **Colocar muita solução entre lâmina e lamínula nas lâminas preparadas a fresco.**

   Nas preparações a fresco, deve-se tomar muito cuidado com a quantidade de solução aplicada. O excesso de solução geralmente suja/molha a platina, danificando a presilha metálica e a lente condensadora abaixo. Em geral, as soluções usadas nessas preparações são corantes, salinas e sacarose.

4. **Girar o canhão das lentes oculares.**

   Não chega a ser um erro, afinal o canhão tem a possibilidade de ser girado, mas esse movimento diário gasta a rosca que o prende ao braço. Com o tempo, o canhão se desprende do microscópio.

5. **Baixar rapidamente a platina com o botão macrométrico.**

   Para retirar a lâmina após a observação, basta baixar delicadamente a platina com o botão macrométrico. Quando isso é feito com rapidez batendo a platina e forçando o macrométrico, este último perde a precisão e, com o tempo, não permite mais focalização e sustentação da platina.

6. **Passar para outra objetiva sem ter focado na anterior.**

   Em cada objetiva colocada o material deve ser focalizado. Nunca passe direto por uma objetiva sem focar, por exemplo, pular a objetiva de 10x entre a 4x e a 40x.

7. **Começar a observação por qualquer objetiva.**

   Sempre comece pela objetiva panorâmica (4x).

8. **Usar o botão macrométrico para focar nas objetivas de 10x, 40x e 100x.**

   Nessas objetivas usa-se somente o botão micrométrico. O macrométrico é usado somente na objetiva panorâmica (4x).

9. **Usar a lente objetiva de 100x sem óleo de imersão.**

   Aconselha-se sempre usar a lente de 100x com óleo, com perigo de arranhar a lente.

10. **Ao colocar óleo de imersão na objetiva de 100x, usar também a objetiva de 40x.**

    O óleo de imersão é usado somente para a objetiva de 100x. A lente de 40x não tem vedação, permitindo a entrada do óleo e danificando a lente.

11. **Baixar a platina entre as lentes objetivas de 10x e 40x para focalização.**

    Depois de focar na objetiva de 10x, pode passar para a objetiva de 40x. Não vai arranhar a lâmina ou objetiva. Se baixar a platina, o foco desaparece e deve ser recomeçado da objetiva panorâmica.

12. **Tocar nas objetivas para trocar de aumento.**

    Essa é a função do revólver. Não se toca nas objetivas.

13. **Na pressa de sair do laboratório, deixar a lâmina no microscópio, luz acesa ou objetiva maior que 4x em uso.**

    Tenha paciência e responsabilidade e acabe a prática corretamente.

3. Inversão de imagem

Coloque um fragmento de régua de plástico transparente (7cm) sobre a platina, simulando uma lâmina histológica. Centralize um número (exceto 0 e 8). Observe na lente panorâmica (4x) e desenhe. Agora, focalize os milímetros da régua, observe com as objetivas 4x, 10x e 40x e desenhe.

Porque não focalizar os números 0 e 8?

O que acontece com o número da régua no microscópio?

Quantos milímetros podem ser visualizados em cada objetiva?

4. Limite de Resolução I

Coloque uma gota de água sobre uma lâmina. Passe levemente o dedo molhado sobre a asa de uma borboleta e encoste na gota de água sobre a lâmina. Cubra com lamínula. Observe e desenhe as diferentes estrias (horizontais e verticais) com as objetivas 4x, 10x e 40x.

Determine o Limite de Resolução de cada uma das lentes usadas.

O que esse Limite representa?

Qual sua relação com o Poder de Resolução?

Como vc descreveria a observação em cada lente objetiva em termos de campo de visão/amplitude e detalhamento?!

6. Profundidade de foco I

Coloque uma gota da suspensão alcoólica (70%) de grão de pólen de flor de *Hibiscus* (popularmente conhecida como ‘graxa’) sobre uma lâmina e cubra com lamínula. Observe e esquematize com as objetivas 4x, 10x e 40x, atentando para os detalhes do material. Mexa cuidadosamente no botão micrométrico e note a profundidade de foco.

Qual a vantagem dessa profundidade?

Porque não notamos essa profundidade nos materiais anteriores?

CAPÍTULO 06

CONHECENDO OS COMPONENTES QUÍMICOS DAS CÉLULAS

Os componentes químicos das células podem ser divididos em inorgânicos e orgânicos. Os componentes inorgânicos consistem em íons, moléculas inorgânicas e água. A água representa cerca de 70% do volume celular e devido às suas propriedades químicas como polaridade, alta capacidade calorífica e formação de ligações de hidrogênio, é indispensável para a homeostase e consequentemente para a manutenção da vida. Os componentes orgânicos são representados pelos carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Esses compostos apresentam funções essenciais às células e podem ser visualizados ou identificados como constituintes celulares quando reagem com outra substância, o que evidencia a sua presença na célula, ou quando são isolados. Neste capítulo, alguns dos componentes químicos celulares serão analisados, utilizando-se para isso reações químicas, que permitirão identifica-los por meio de alterações moleculares em determinados componentes, que resulta em notável diferença em suas características visuais; extração de componentes químicos celulares; e por visualização após exposição a determinadas substâncias corantes.

Experimento 01

Identifique 5 placas de petri médias (Água, Água fervida, NaCl, Ácido acético e HCl). Abra um ovo e separe a gema da clara. Reserve a clara. Distribua as soluções e o material biológico conforme a tabela abaixo:

	Placa 1	**Placa 2***	**Placa 3**	**Placa 4**	**Placa 5**
Material biológico (3 ml)	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
Solução (3 ml)	Água	Água	NaCl 5M	Ácido acético 5M	HCl 5N
Resultados					

*Transferir para um tubo de ensaio termo-resistente, ferver por 10 minutos e retornar o conteúdo na placa.

Qual componente bioquímico foi afetado nesse experimento?

A que se devem cada uma das mudanças ocorridas?

Qual a função da placa 01?

Comparando o resultado obtido com os dos dois ácidos, qual experimento teve efeito mais marcante? Por quê?

Experimento 02

Coloque uma gota do corante Lugol em cima de cada um dos alimentos distribuídos nas placas de Petri sobre a bancada. Observe as colorações e anote os resultados na tabela abaixo.

Alimento	**Coloração**	**Alimento**	**Coloração**
Batata		Açúcar	
Cebola		Pão	
Arroz		Cenoura	
Farinha		Beterraba	
Macarrão		Banana madura	
Leite em pó		Banana verde	

Que componente químico está sendo evidenciado?

Experimento 03

Com o auxílio de uma lâmina afiada retire pequenos fragmentos de uma batata inglesa, da forma menos espessa que conseguir. Coloque os fragmentos sobre uma lâmina e pingue uma gota de Lugol em cada pedaço e deixe descansar por três minutos. Coloque lamínula e observe.
O que são as estruturas observadas?

Qual sua principal função para este vegetal?

Experimento 04

Com o auxílio de uma lâmina de barbear, realize um corte tangencial na casca de uma laranja, este deve ser muito fino, o suficiente para que a luz possa transpassá-lo. Pingar algumas gotas de azul de metileno, em um vidro de relógio contendo o corte efetuado na laranja. Aguardar 7 minutos. Utilizando uma pinça, retire o pedaço da casca da laranja, coloque dentro de um tubo de ensaio e lave-o muito bem, com água abundante até retirar todo o excesso de corante. Transfira o corte para uma lâmina, cubra com a lamínula e observe. Identifique a presença de componentes globulares.
O que são e onde eles estão armazenados?

Por que ao descascar uma laranja ocorre a liberação do “sumo”?

CAPÍTULO 07

BRINCANDO COM AS MEMBRANAS CELULARES

As biomembranas estão presentes nas células na forma da membrana plasmática e das membranas que envolvem as organelas nos seres eucariotos. São constituídas basicamente por uma dupla camada de fosfolipídios onde estão associadas moléculas de proteínas e carboidratos, constituindo um mosaico fluido. A membrana plasmática separa o meio intracelular do extracelular e promove, entre outras funções, a manutenção do meio citoplasmático; age como uma barreira seletiva que controla a entrada e a saída de substâncias; permite a comunicação entre as células, pela presença de receptores em sua superfície; estabelece conexões com as células entre si e com a matriz extracelular. As biomembranas não podem ser vistas ao microscópio óptico, porém seu transporte de substâncias pode ser observado. De maneira geral, substâncias lipofílicas atravessam, por difusão passiva, as membranas mais facilmente, enquanto as substâncias hidrofílicas precisam de outros mecanismos para atravessar a barreira, como o transporte ativo e a difusão facilitada. A membrana celular é bastante permeável à água, portanto o movimento da água é bem evidenciado na célula se houver alguma alteração na pressão osmótica do meio extra ou intracelular. As práticas contidas neste capítulo são baseadas no movimento de substâncias através da membrana plasmática e sua consequência para a célula.

Experimento 01

Identifique três tubos de ensaio, distribua as soluções, agite bem. Aguarde cerca de 1 hora.

Tubo 01	**Tubo 02**	**Tubo 03**
4ml de água	2ml de água	2ml de água
-	2ml de acetona PA	2ml de detergente concentrado
1 cubo de beterraba*	1 cubo de beterraba*	1 cubo de beterraba*

*Os cubos de beterraba foram lavados em água corrente por 12 horas.

Quais as diferenças visuais observadas em cada tubo?

Qual o papel do tubo 01?

Como foi a atuação da acetona e do detergente?

Experimento 02

Prepare os tubos de 1 a 5 conforme a tabela:

Componentes	**Tubo 01**	**Tubo 02**	**Tubo 03**	**Tubo 04****	**Tubo 05****
Levedo*	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Água	1ml	-	-	-	-
Corante	-	1ml ***Corante Aquoso***	1ml ***Corante Alcoólico***	1ml ***Corante Aquoso***	1ml ***Corante Alcoólico***

*Preparação do levedo: dissolva ½ tablete de fermento em 100ml de água e acrescente 1 colher de chá de açúcar. Faça pouco antes da aula e mantenha sob refrigeração.

**Use Tubos termo resistentes e ferva-os

Coloque uma gota da solução de cada tubo em lâminas já numeradas, analise ao microscópio e, após a observação na lente objetiva de 40x, anote os resultados.

Tubos	Coloração dos Levedos (sim/não, muito/pouco)	Outras observações
01		
02		
03		
04		
05		

Qual a função do tudo 01?

Qual o efeito da temperatura sobre o levedo nos tubos 04 e 05?

Experimento 03

Retire um pedaço da epiderme de uma folha de *Tradescantia* sp. (conhecida como 'coração roxo'), rasgando a epiderme superior sobre a inferior. Coloque sobre uma lâmina com uma pequena gota de água, cubra com lamínula e observe a morfologia celular. Em seguida, remova a lâmina do microscópio sem mexer no charriot e pingue, delicadamente, solução de NaCl 5M em um lado da lamínula. No outro lado, coloque um pedaço de papel de filtro em contato com a lamínula. Mantenha o procedimento por alguns minutos e observe ao microscópio novamente.
Descreva o que aconteceu.

Como soluções iso, hipo e hipertônicas agem sobre as células

Experimento 04

Passe algodão embebido em álcool no dedo indicador e com o auxilio de uma micro lanceta descartável, fure a ponta do dedo. Separe três lâminas histológicas, contendo uma gota de solução de NaCl 0,6%, 0,9% e 2% e coloque uma gota de sangue sobre cada uma. Cubra as três lâminas com lamínula. Observe e desenhe o observado em cada lâmina.

Como soluções iso, hipo e hipertônicas agem sobre as células animais e vegetais?

CAPÍTULO 08

ENTRANDO NO NÚCLEO CELULAR

O núcleo é uma organela característica das células eucariontes. Nele está a maior parte do DNA da célula, que se encontra complexado com proteínas e compactado, formando a cromatina. Este material genético constitui os genes, que controlam a morfologia e as atividades celulares através da produção de RNA e da síntese proteica.

O núcleo é envolvido por uma dupla membrana de proteínas e lipídeos, chamada de envoltório nuclear, onde há vários poros que permitem a troca de substâncias entre núcleo e citoplasma. É a organela de mais fácil identificação ao microscópio óptico, pois é grande, se cora facilmente e encontra-se individualizado. Porém, é sujeito a variações morfológicas dependendo da célula a qual pertence, podendo ser mais arredondado, achatado ou alongado. As células podem apresentar-se sem núcleo (célula anucleada), com dois núcleos (células binucleadas) ou com mais de dois núcleos (células multinucleadas).

Sua localização na célula também pode variar, mas geralmente encontra-se na região central.

Em células com intensa atividade de síntese proteica o núcleo encontra-se mais desenvolvido e em alguns casos pode-se visualizar a cromatina condensada e os nucléolos (regiões onde são sintetizados os RNAs ribossômicos).

Com as aulas deste capítulo poderão ser observadas células com grandes variações nucleares, podendo todas essas variações serem correlacionadas com as atividades da célula e do tecido onde é encontrada, evidenciando os diferentes graus de atividade nuclear.

Observe as lâminas listadas abaixo e complete o quadro:

01. Lâmina permanente de Corte de Língua

02. Lâmina permanente de Corte de Testículo

03. Lâmina permanente de Esfregaço de Sangue

04. Lâmina permanente de Corte de Cérebro/Cerebelo

05. Lâmina permanente de Corte de Fígado

06. Observação a fresco: Células da mucosa bucal

Limpe o interior da boca em água corrente. Coloque uma gota de água numa lâmina histológica. Pegue uma espátula de madeira, raspe a superfície interna da bochecha e coloque o material coletado sobre a gota na lâmina. Core o material com fucsina básica e cubra com lamínula.

07. Observação a fresco: Epiderme da cebola

Faça um corte transversal em uma cebola e retire um pedaço da epiderme de uma das camadas internas. Coloque-o sobre uma lâmina histológica. Core com uma pequena gota de Giemsa, azul de metileno ou Lugol. Cubra com lamínula e observe.

Tipos celulares	**Formato celular**	**Formato nuclear**	**Localização nuclear (central ou periférica)**	**Nucléolo evidente? (sim ou não)**	**Condensação cromatínica (alta ou baixa)**
Musculares (língua)					
Epiteliais (língua)					
Germinativas imaturas (testículo)					
Germinativas maduras (testículo)					
Eritrócitos (sangue)					
Leucócitos (sangue)					
Neurônio (Cérebro ou Medula)					
Hepatócito (fígado)					
Epitélio bucal					
Epiderme de cebola					

CAPÍTULO 09

REPRESENTANDO A SÍNTESE PROTEICA

As moléculas celulares, exceto o DNA, estão em constante renovação. Para que isso ocorra é necessária a síntese de mais moléculas de acordo com a demanda de cada célula, para garantir a manutenção de suas estruturas e funções.

As células também sintetizam substâncias que são enviadas para o meio extracelular e irão exercer as mais variadas funções, de acordo com sua natureza química e do tecido onde se encontra, contribuindo para a homeostase do organismo.

A síntese e a secreção dos compostos nas células são controladas por informações provenientes do núcleo celular, que controla a quantidade e o tipo de molécula a ser sintetizada. São realizadas pelo trabalho conjunto de organelas especializadas, que são os ribossomos, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Durante o processo de síntese, as moléculas são bioquimicamente marcadas, e esses marcadores definem para onde a molécula será transportada. O transporte das moléculas recém-sintetizadas ocorre por meio de vesículas, que são formadas ao término do processo de síntese.

Essas organelas responsáveis pela síntese e secreção não podem ser visualizadas ao microscópio óptico. Assim, neste capítulo a síntese de proteínas é abordada de forma teatral, onde cada aluno representa uma estrutura no interior da célula que exerce uma função durante a síntese. Agindo de forma conjunta e organizada a participação de todos resultará na formação de uma estrutura que representa uma proteína sintetizada em uma célula.

Teatro de síntese proteica

Síntese de uma proteína solúvel no citoplasma onde cada aluno representa um componente (personagem) da síntese. Os alunos recebem placas/balões/acessórios de identificação para cada um dos personagens abaixo. Apesar de cada aluno representar um personagem, aconselha-se que os alunos entendam sua função na síntese e atentem para a atuação dos demais personagens.

O teatro é feito em 02 atos:

Primeiro Ato: Ativação dos Aminoácidos pela Aminoacil RNAt Sintetase

Personagens:

1. RNAt (metade do restante da turma)
2. Aminoácidos (metade restante da turma)
3. Aminoacil RNAt Sintetase (4 alunos)
4. Código Genético (1 aluno)

Com base no Código Genético, as enzimas Aminoacil RNAt Sintetase devem fazer a ligação dos aminoácidos livres no citoplasma aos seus RNAt correspondentes. É importante lembrar que o Código Genético faz a relação dos códons do RNAm com os aminoácidos da proteína.

Segundo Ato: Formação da proteína

Personagens:

1. Subunidade maior
2. Subunidade menor
3. RNAm (dois alunos)
4. RNAt + aminoácido (vários alunos)
5. Peptidil transferase
6. Fator de terminação
7. Código genético

Assim como acontece na célula, o RNA mensageiro se associa a Subunidade menor do ribossomo e o primeiro aminoácido ativado (RNAt + aminoácido) é adicionado no sítio P. Neste momento, a Subunidade maior se associa ao complexo para que os demais aminoácidos ativados sejam adicionados no sítio A. Lembrando que tudo é feito com base no Código Genético. Simultaneamente, a enzima Peptidil transferase faz as ligações peptídicas até a chegada do códon de parada, quando o Fator de Terminação desfaz o complexo e libera a proteína no citoplasma.

CAPÍTULO 10

ENTENDENDO OS CLOROPLASTOS

Os cloroplastos são organelas pertencentes ao grupo dos plastos, que são estruturas características das células vegetais. São classificados como cromoplastos, pois possuem pigmentos coloridos.

Revestidos por uma dupla membrana, possuem material genético e ribossomos. Em seu interior há uma rede de membranas, que se comunica com a membrana interna e que formam os chamados tilacóides, que são vesículas achatadas e sobrepostas que se intercomunicam, onde há moléculas de clorofila e de outros pigmentos. A clorofila é essencial, pois ela absorve a energia luminosa, o que possibilita a formação de carboidratos e oxigênio (O_2) a partir de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) através de uma série de reações enzimáticas e de oxi-redução, que consiste no processo denominado fotossíntese.

Os cloroplastos são facilmente visualizados ao microscópio óptico, possuem coloração verde devido à clorofila e podem apresentar-se em formas e quantidades diferentes de acordo com a espécie, o tecido e as condições do vegetal.

Neste capítulo os cloroplastos serão visualizados em preparações a fresco, permitindo o reconhecimento e a diferenciação desta organela em diferentes espécies.

1. **Preparação a fresco: Elodea (planta aquática)**

Retire uma folha de Elodea e coloque em uma lâmina com uma pequena gota de água. Cubra com a lamínula e observe a presença, a morfologia e a localização dos cloroplastos no material. Esquematize a célula vegetal e seus cloroplastos nas objetivas de 10x e 40x.

2. **Preparação a fresco: *Tradescantia* sp..**

Retire um pedaço da epiderme de uma folha de *Tradescantia* sp. (conhecida como ‘coração roxo’), rasgando a epiderme superior sobre a inferior. Coloque sobre uma lâmina com uma pequena gota de água, cubra com lamínula e observe. Observe os cloroplastos nas células dos estômatos.

3. **Preparação a fresco: Algas**

Colete em um recipiente uma amostra de água da margem de um córrego. Pingue uma gota em uma lamina de vidro, cubra com lamínula e observe os diferentes tipos de algas e seus cloroplastos.

CAPÍTULO 11

DESVENDANDO A MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular é formada por componentes fluidos e fibrosos, formando uma estrutura onde basicamente proteínas fibrosas ficam dispostas em um gel hidrofílico constituído por polissacarídeos e proteínas, formando uma rede que envolve as células e preenchem os espaços entre elas.

O aspecto da matriz extracelular está diretamente relacionado com o tipo celular, uma vez que seus constituintes são produzidos e secretados pelas próprias células presentes no tecido. Podem então apresentar-se de forma bastante diferenciada, como as paredes celulósicas das células vegetais e na parede das células bacterianas.

Possui grande importância para a função tecidual, conferindo entre outras propriedades resistência e elasticidade aos tecidos, sendo particularmente abundante nos tecidos conjuntivos.

Nas aulas deste capítulo poderão ser avaliados e identificados constituintes da matriz extracelular na célula vegetal e animal, bem como discutidos o papel dos seus constituintes nos tecidos.

1. Preparação a fresco: Tendões em soluções de acido acético e em água

Retire dois tendões do mesmo tamanho de coxas frescas de frango. Prepare dois vidros de relógio, um contendo água destilada e outro ácido acético 0,5M. Coloque um pedaço de tendão em cada vidro e deixe em repouso por uma hora. Observe o que aconteceu.

O que confere rigidez aos tendões?

Quais as modificações ocorridas na matriz extracelular do tendão?

Qual é a importância do ácido acético nesse procedimento?

2. Preparação a fresco: Caule de *Tradescantia* sp..

Obtenha um pedaço jovem de caule de *Tradescantia* sp. (conhecida como ‘coração roxo’). Com uma lâmina afiada faça cortes transversais no caule, o mais fino que conseguir, para que a luz do microscópio possa transpassá-lo. Coloque o material sobre uma lâmina de vidro e adicione uma gota de água. Cubra com lamínula, observe e esquematize a matriz extracelular presente. De que é composta essa matriz e como se organiza?

3. Lâmina permanente de orelha

Observe o tecido cartilaginoso.

De que é composta essa matriz e como se organiza?

4. Lâmina permanente de tecido conjuntivo propriamente dito

Caracterize o tecido observado.

Como o colágeno é sintetizado?! E qual o nome das células que o produz?

5. Lâmina permanente de tendão

Caracterize o tecido observado.

O que confere resistência ao tendão?

CAPÍTULO 12

MEXENDO O CITOESQUELETO

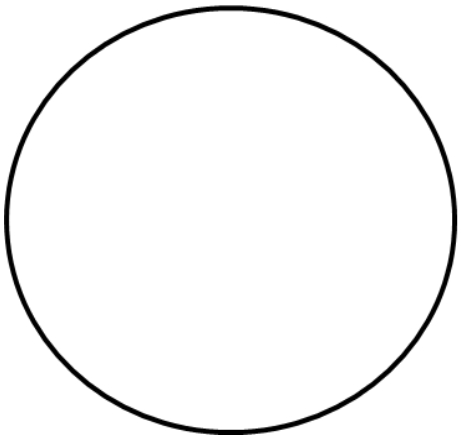
O citoesqueleto é formado por uma rede complexa e dinâmica de filamentos proteicos que se estende por todo o citoplasma das células eucariontes. Estes filamentos são basicamente de três tipos: os filamentos intermediários (formados por proteína fibrosa), os microtúbulos (formados por tubulina) e os filamentos de actina (formados por actina).

O citoesqueleto serve de apoio à membrana plasmática, sendo responsável pela manutenção da forma da célula, assim como pela movimentação de suas estruturas internas e de toda a célula. É de importância fundamental para várias atividades, como na divisão celular, na contração, na migração e na comunicação entre as células.

Os filamentos proteicos não podem ser observados ao microscópio de luz, porém neste capítulo sua presença será evidenciada pela visualização dos movimentos celulares, como a ciclose e os movimentos de estruturas que permitem a migração das células, os cílios e flagelos.

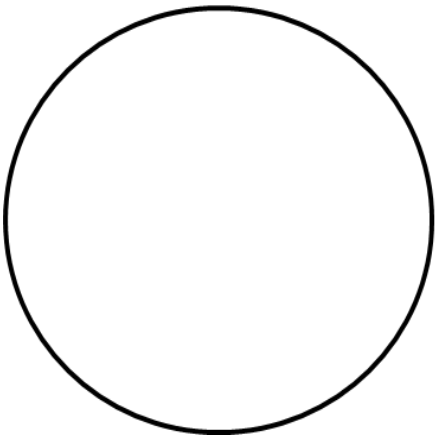
1. **Lâmina permanente de Corte de Testículo**

Identificar os flagelos dos espermatozoides na objetiva de 40x e esquematizar.



2. **Lâmina permanente: Traqueia**

Identificar os cílios nas células epiteliais na objetiva de 40x e esquematizar.



Compare as lâminas 1 e 2 segundo: número de cílios e flagelos por célula; comprimento de cílios e flagelos nas diferentes células; função de cílios e flagelos nas diferentes células.

3. **Observação a fresco: Elodea (planta aquática)**

Mantenha folhas de Elodea imersas em água em local fortemente iluminado por alguns dias. Pegue uma folha e coloque sobre uma lâmina histológica com uma gota de água e cubra com lamínula. Observe movimento de ciclose dos cloroplastos.

Qual estrutura intracelular é responsável pelo movimento de ciclose?

4. **Observação de organismos unicelulares e multicelulares**

Aproximadamente 15 dias antes da aula, coloque uma amostra de água (500ml) de um ambiente (poças de terreno vazio, margens de rios, córregos, lagos) em um recipiente parcialmente fechado. Acrescente grãos de arroz cru, folhas de alface, couve e/ou capim. Cubra com uma gaze e prenda-a com um elástico. Deixe essa suspensão em um ambiente que receba luz solar indireta. Coloque uma gota da suspensão (da superfície ou do fundo) em uma lâmina, cubra com uma lamínula e observe a movimentação dos organismos. Se necessário, coloque a gota da suspensão com um pouco de algodão desfiado que limita a movimentação dos mesmos, facilitando a observação. Para melhor visualização dos cílios, pingue uma gota de formol 10% na lâmina e aguarde.

Qual é a importância da presença de cílios e flagelos para os micro-organismos?

A forma de deslocamento dos protozoários ciliados é a mesma que a dos flagelados?

Em termos de quantidade, qual a relação entre cílios e flagelos nessas células?

CAPÍTULO 13

ACOMPANHANDO A DIVISÃO CELULAR

A divisão é o mecanismo que permite a reprodução celular, processo fundamental para a formação e manutenção da vida. Há dois tipos de divisão celular: a mitose e a meiose. Para que estes processos ocorram são necessários vários eventos coordenados que permitem que a célula aumente seu conteúdo e se divida. O período entre duas divisões celulares é chamado de ciclo celular, neste período a célula cresce, se prepara para a divisão e se divide.

A mitose é o principal mecanismo de reprodução dos micro-organismos unicelulares eucariotos, e nos seres pluricelulares é responsável pela formação e manutenção do organismo. Com a mitose, uma célula origina duas células filhas geneticamente idênticas à célula mãe.

O período em que a célula ainda não está se dividindo é geralmente o mais longo e é chamado de intérfase, que pode ser dividido em três períodos: G_1, que consiste no período anterior à duplicação do DNA; S, onde ocorre a duplicação do DNA e G_2, período entre a duplicação de DNA e o início da divisão celular. A mitose é dividida didaticamente em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Cada fase possui características distintas, que permitem sua identificação.

A meiose é o meio pelo qual os organismos sexuados produzem seus gametas, sendo fundamental para a reprodução.

Na meiose muitos acontecimentos são similares aos da mitose, sendo a principal diferença da meiose a ocorrência de duas divisões celulares seguidas, e, assim como na mitose, apenas uma duplicação do DNA, o que resulta em quatro células filhas com DNA reduzido à metade em relação à célula mãe.

As fases das divisões da meiose são separadas assim como na mitose, porém, aqui a prófase da primeira divisão (prófase I) é subdividida em cinco etapas: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese.

Durante os processos de divisão celular o material genético de condensa ainda mais, formando os cromossomos e o envoltório nuclear se desintegra, entre outras várias modificações. Nessas condições as células em divisão podem ser identificadas ao microscópio óptico e classificadas de acordo com a fase do ciclo em que se encontram. Assim, nas aulas

deste capítulo devem ser identificadas e classificadas células durante diferentes etapas do ciclo celular.

1. **Raiz de cebola**

Pegue uma cebola, corte a parte inferior e coloque-a na água por uma semana.

Retire 0,5 cm das pontas das raízes em crescimento e fixe em etanol: ácido acético (3:1) por 15 minutos. Em seguida, lave em água e armazene em álcool 70% à 4^0 C.

No laboratório, faça uma hidrólise do material, mergulhando as pontas das raízes em solução de HCl 4N por 1h15 e em seguida, lave bem em água. Coloque a raiz sob uma lâmina histológica e core com orceína por 5 minutos. Faça o esmagamento utilizando uma lamínula e observe ao microscópio de luz as diferentes fases da divisão celular, bem como as células em intérfase.

Qual o papel da hidrólise?

E do esmagamento?

As divisões celulares observadas referem-se a Mitose, Meiose ou ambas? Porque?

Porque escolher as pontas em crescimento?

Usando a objetiva de 40x, quais as diferenças observáveis em cada fase? Esquematize as fases do ciclo visualizadas.

2. Lâmina permanente de testículo

Observe no interior dos túbulos seminíferos as diferentes fases da espermatogênese, atentando para as variações nucleares e divisões que acompanham este processo.

Como vc descreveria as mudanças nucleares ocorridas?

Que células deste tecido sofrem meiose?

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

JORDÃO, B. Q.; ANDRADE, C. G. T.J; RUAS, C. F.; CÓLUS, I. M. S.; BUIM, M. E. **Práticas de biologia celular.** Londrina: EdUEL, 1998.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de biologia celular.** São Paulo: Edgard Blücher, 1980.

MELO, R. C. N. **Células & Microscopia. Princípios básicos e práticas.** Juiz de Fora: EdUFJF, 2002.

NORMANN, C. A. B N. **Práticas em Biologia Celular.** Porto Alegre: Sulina, 2008.

POLIZELI, M. L. T. M. **Manual prático de biologia celular.** Ribeirão Preto: Holos, 2008.

REIS FILHO, H. S.; RIBEIRO, C. A. O. **Técnicas e Métodos Para Utilização Prática de Microscopia.** São Paulo: GEN, 2012.

SOARES, C. P.; SILVA, N. S. **Práticas de biologia celular.**

VALLE, F. C. **Manual para aulas práticas de citologia e genética.** São Paulo: Font & Julia, 1985.

ISBN 978-85-920343-0-6