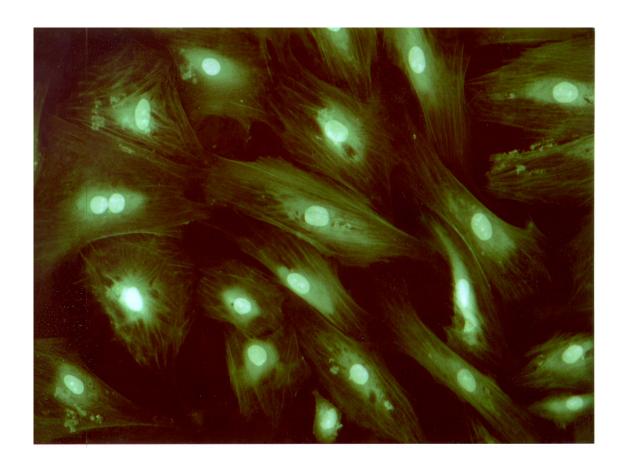
PRÁTICAS DE BIOLOGIA CELULAR



Cristina Pacheco Soares Newton Soares da Silva

SUMÁRIO

Considerações Gerais sobre a utilização do Laboratório01
Dimensões em Biologia, Instrumentos e Técnicas Usadas em Citologia 04
Microscopia
Observação do Microscópio Óptico Comum26
Utilização do Microscópio Óptico Comum30
Diversidade Celular31
Observação de Células Vegetais34
Dissociação do Epitélio da Mucosa Oral35
Observação dos Componentes em Célula Vegetal Viva36
Observação de Vacúolos e Leucoplastos38
Observação de Células de Elódea40
Movimento da Água Através da Membrana41
Prova da Permeabilidade Seletiva na Membrana43
Permeabilidade Diferencial em Células Vivas44
Observação de Estômatos47
Observação de Mitocôndrias em Células Vivas51
Classificação dos Cromossomos Humanos e Montagem de Cariótipo53
Simulação da 1ª Lei de Mendel
Estudo dos Tecidos Animais59
Bibliografia Recomendada60

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA Nº.

Prof.: Da	ata:/	·	'
-----------	-------	---	-------

Considerações gerais sobre a utilização do laboratório

- a) Os horários de aula deverão ser obedecidos com rigor.
- b) É aconselhável o uso de avental, pois além de proteger a roupa, condiciona o aluno à limpeza e disciplina.
- c) O aluno que danificar o material permanente ou de consumo, mesmo casualmente, deverá indenizar a Escola, a critério do professor.
- d) Não jogue lixo nas pias, mas em cestos apropriados e embrulhados em papel.
- e) Não risque as bancadas. O aluno deverá encontrar seu lugar limpo e assim deixá-lo para o colega seguinte. Se observar algo errado comunique ao professor assim que chegar, pois o professor terá condições de localizar o grupo desordeiro. Limpe seu lugar quando terminar o trabalho.
- f) Observe, ao sentar-se, se as torneiras de gás à frente estão fechadas e desobstruídas, pois qualquer alteração pode causar vazamento que você estará inspirando.
- g) Não é permitida a passagem de alunos para o laboratório de microbiologia pelo interlab. Mude de sala pelo corredor de fora.
- h) Você irá trabalhar em grupos formados sob seu critério. Portanto escolha bem seus companheiros de trabalho.

Como documentar o curso

Todo trabalho científico precisa ser documentado. No caso de Biologia o desenho esquemático é muito importante desde que seja realizado com honestidade, isto é, sem criações, sem a influência do esquema do professor, com atenção e sem pressa.

- 1. Leia todo o roteiro da experiência que vai fazer, antes de iniciar o trabalho para ficar claro o que vai ser realizado.
- 2. Separe todo o material necessário antes de começar o trabalho.
- 3. Siga especificamente as indicações de tempo, material, etc. como o roteiro indica.
- 4. Após usar, coloque cada material no local indicado para não misturar componentes.
- 5. Só esquematize o que você de fato vê. Não dê asas a sua imaginação. Isto é um trabalho científico e não uma obra de arte. Se alguma estrutura deveria ser exibida e não aparece, anote o sucedido por escrito em seu roteiro, porém procure bem antes de proceder desta forma. A qualidade dos esquemas é importante para sua compreensão.
- 6. Leia o roteiro com atenção. Solicite auxílio do professor só em último caso.
- 7. Anote todos os dados. Na hora eles podem não parecer importantes, mas o serão para as conclusões.
- 8. Escreva em linguagem simples e clara e evitará enganos.
- 9. Não use lápis de cor ou similar, régua a menos que o roteiro instrua em contrário. Os desenhos serão feitos **a lápis**, a mão livre.
- 10. Coloque o nome, número e a turma a tinta e no lugar indicado. Não se esqueça que os relatórios são individuais.
- 11. Os esquemas devem ser acompanhados de legendas e explicações por escrito e eventualmente gráficos. Tudo que você desenhou tem nome.
- 12. Quando o roteiro solicitar que você faça o mesmo esquema com diferentes aumentos, note que os desenhos não terão tamanhos diferentes, terão detalhes a mais ou menos.
- 13. O roteiro foi programado para ser executado durante a aula. Habitue-se a trabalhar com regra e horário, pois caso você não termine, não poderá fazê-lo em casa, uma vez que você não dispõe do material necessário. Não passe a limpo, pois isso é o mesmo que copiar figuras e os esquemas devem partir do natural.
- 14. Lembre-se que o relatório deve estar correto e agradar aos olhos (esteticamente falando).

Do seu desempenho e comportamento depende a sua nota de laboratório. Seja objetivo, consciente e responsável.

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º

DC .	 D-4	1
Prot :	Data.	/
	 Data	/

Tema: DIMENSÕES EM BIOLOGIA, INSTRUMENTOS E TÉCNICAS USADOS EM CITOLOGIA, DIMENSÕES EM BIOLOGIA

As dimensões das estruturas biológicas podem agrupar-se em dois grandes grupos, macroscópicas, isto é, visíveis ao olho humano e microscópicas, isto é, invisíveis ao olho humano, tendo como fronteira o poder de resolução do olho humano. As unidades de medida utilizadas nestas dimensões estão, assim, adaptadas sendo as mais freqüentemente utilizadas o micrômetro (µm) para a microscopia óptica e o nanômetro (nm) e o angstrom (Å) para a microscopia eletrônica. A sua relação com a unidade fundamental do sistema métrico, o metro (m) e com o milímetro (mm) é a seguinte:

1 μ m = 10 ⁻⁶ m = 10 ⁻³ mm (0,001 mm) 1 nm = 10 ⁻⁹ m = 10 ⁻⁶ mm (0,000001 mm) 1 \mathring{A} = 10 ⁻¹⁰ m = 10 ⁻⁷ mm (0,0000001 mm)

Nesta disciplina iremos falar muito em especial do mundo microscópico e como tal face ás dimensões das estruturas celulares que, salvo raras exceções como é o caso da acetabulária, da gema do ovo e de alguns feixes líberos-lenhosos, são invisíveis ao olho humano, é por demais óbvio a necessidade de utilização do microscópio uma vez que o limite de resolução do olho humano é de 100 µm (0,1 mm). Em termos de formação de imagem é fundamental percebermos o significado de três conceitos muito importantes, que são o poder de ampliação, o poder de resolução e o de limite de resolução.

Poder de ampliação: capacidade de um aparelho aumentar *n* vezes uma imagem. Na microscopia é dado pelo produto entre a ampliação das oculares e a ampliação das objetivas.

Poder de resolução: capacidade de um aparelho fornecer imagens distintas de dois pontos distintos.

Limite de resolução: distância mínima a que dois pontos podem estar para o aparelho os mostrar individualizados.

O que determina pois a riqueza dos detalhes da imagem fornecida por um sistema de imagens é o seu poder de resolução e não o seu poder de ampliar o tamanho dos objetos. A capacidade de aumentar só tem valor prático se for acompanhado de um aumento do poder de resolução. Este limite de resolução depende essencialmente da objetiva, já que as oculares não

podem acrescentar detalhes à imagem, pois a sua função é aumentar de tamanho essa imagem, que é projetada no seu plano de focagem pela objetiva.

INSTRUMENTOS USADOS EM CITOLOGIA

Microscopia:

Óptica:

Campo luminoso

Campo escuro

Ultravioleta

Fluorescente

Contraste de fase

Eletrônica:

Transmissão

Varredura

TÉCNICAS USADAS EM CITOLOGIA

Citoquímicas

Permitem estudar a localização intracelular das diversas substâncias que compõem as células, através de técnicas *in sit*u, nas quais as células são preservadas intactas e as substâncias detectadas por técnicas que dão reações coradas ou cujo produto é eletrondenso, ou *extra situ*, que se baseiam no fracionamento celular e no estudo dos componentes isolados.

No primeiro caso procede-se à execução de preparações definitivas com colorações específicas, no segundo caso recorre-se a outras técnicas laboratoriais, tais como, centrifugação, filtração, com posterior utilização dos produtos obtidos para identificação e quantificação por técnicas de cromatografia, espectrofotometria entre outras.

Imunocitoquímicas

As técnicas de imunocitoquímica permitem o estudo da localização intracelular de proteínas específicas, sendo estas técnicas muito superiores ás técnicas de identificação de proteínas baseadas na verificação de aminoácidos. Estas técnicas baseiam-se na reação antigeno-anticorpo.

Radiofotografia

A radiofotografia é aplicada como uma técnica citoquímica *in situ* para a detecção de isótopos radioativos e baseia-se na sensibilidade das emulsões fotográficas ás radiações ionizantes. Como não existem nas células elementos radioativos, podemos seguir pela radiofotografia a incorporação e a movimentação de compostos radioativos, introduzidos nas células com finalidades experimentais.

Prof · Data: / /	
Urot · I loto · / /	
1 IVI Dala	

MICROSCOPIA

A microscopia tem a maior importância no estudo das células. Muitas características importantes de interesse nos sistemas biológicos são demasiado pequenas para serem vistas a olho nu, só podendo portanto, ser observadas com o microscópio.

Nos anos mais recentes, tem-se notado um grande desenvolvimento em microscópios, corantes, protocolos de coloração e técnicas de preparação para ajudar a esclarecer melhor a estrutura e função das células.

Descreveremos as capacidades e aplicações das várias técnicas de microscopia usadas para visualizar as células, as suas estruturas subcelulares e ainda as suas moléculas.

As **estruturas celulares** que necessitamos de estudar têm **dimensões** que, em regra, são invisíveis à vista desarmada. 1mm (milímetro) = 1 000 μ m (micrômetro) = 1 000 000 nm (nanômetro) = 10 000 000 Å (Angstrom).

O olho humano só consegue formar imagens de objetos com dimensões superiores a cerca de 0,2mm. Para observar objetos menores é necessário formar deles uma imagem ampliada.

Os **microscópios** são os aparelhos utilizados para formar essas imagens.

Radiação eletromagnética

Os microscópios usam **radiações eletromagnéticas** para formar imagens ampliadas dos objetos a observar.

O microscópio óptico usa a **luz visível** (radiação eletromagnética com comprimento de onda compreendido entre 400 e 800 nm).

O **microscópio eletrônico** usa **raios catódicos (feixe de elétrons)** cujo comprimento de onda é inversamente proporcional à voltagem de aceleração dos elétrons usados no microscópio, sendo de 0,0037nm para uma voltagem de 100KV.

Resolução e ampliação

Há um limite mínimo para a dimensão dos objetos que podem ser observados com um determinado sistema óptico, limite esse que se denomina **resolução** do sistema.

Por exemplo, a resolução do olho humano é de cerca de 0,2mm, e é determinada pela estrutura celular da retina. A de um microscópio óptico é de 0,2mm e é limitada pelo comprimento de onda da luz visível.

A **ampliação** da imagem produzida pelo sistema óptico permite observar objetos de dimensões inferiores a 0,2 mm (resolução do olho humano), mas apenas até ao limite de resolução do sistema óptico. Objetos menores que este limite não podem formar imagens, por maior que seja a ampliação utilizada.

A ampliação útil é a ampliação necessária para que a imagem do objeto se torne visível, ou seja, para que atinja dimensões iguais ou superiores ao limite de resolução do olho humano. Para conforto do observador, as imagens são ampliadas até dimensões que tornam a sua observação confortável. O fator de ampliação adicional é a ampliação vazia.

Exemplo: Para que um objeto no limite de resolução do microscópio óptico se torne visível é necessário ampliá-lo: $0.2 \, \text{mm} / 0.2 \, \text{\mu m} = 200 \, \text{\mu m} / 0.2 \, \text{\mu m} = 1000 \, \text{m}$ x. Para uma observação confortável, podemos ampliá-lo até 1mm, utilizando um fator de ampliação adicional de 1mm/0,2mm=5.

Vê-se assim que a ampliação útil de um microscópio óptico não excede as 1000x

Tipos de microscópio

O limite de **resolução** de um microscópio depende do comprimento de onda da radiação eletromagnética usada para formar a imagem e de **aberrações das lentes.**

Deste modo, pode-se melhorar a resolução construindo microscópios que utilizem

radiações de comprimento de onda menor que o da luz visível. A construção deste tipo de microscópios depende da capacidade de produzir **lentes** para a radiação em causa. A radiação ultravioleta permite algum ganho de resolução, mas é usada principalmente nos **microscópios de fluorescência**. Os **raios-X** começam a poder ser usados com lentes especiais, e raios-gama não foram ainda usados por falta de dispositivos que possam funcionar como lentes. Os

raios catódicos (**feixes de elétrons**) utilizam **++** e são usados nos microscópios eletrônicos.

Nos microscópios mais comuns, o feixe de radiação é estático e irradia simultaneamente toda a área observável da amostra. Noutros aparelhos (**microscópios de varredura**), o feixe possui dimensões muito reduzidas irradiando apenas um ponto da amostra, e é dotado de um movimento relativamente àquela, irradiando em seqüência todos os pontos do objeto (**varredura**).

O microscópio óptico usa a luz visível como radiação eletromagnética.

Os componentes principais do microscópio óptico são:

- · Fonte luminosa:
- · Condensador
- · Diafragmas de campo e do condensador
- · Platina
- Objetiva
- Tubo
- Oculares

MICROSCÓPIO ÓPTICO FOTÓNICO COMUM

No microscópio óptico de transmissão a luz emitida pela fonte luminosa e concentrada pelas lentes condensadoras, atravessa a amostra e penetra na objetiva. A objetiva forma uma **imagem real**, ampliada, do objeto e as oculares formam uma **imagem virtual**, também ampliada, da imagem real produzida pela objetiva. A imagem virtual situa-se à distância de 25cm do olho do observador, e é a imagem que pode ser observada. A ampliação total é o produto dos fatores de ampliação da objetiva e das oculares, podendo existir outros dispositivos no trajeto da luz que introduzam fatores multiplicativos adicionais. O feixe luminoso que atravessa a amostra é modificado por interações com esta, que consistem na absorção de certos comprimentos de onda produzindo **cor**, **difração**, **refração**, **reflexão**, **diferença de fase** etc. Estas interações vão-se

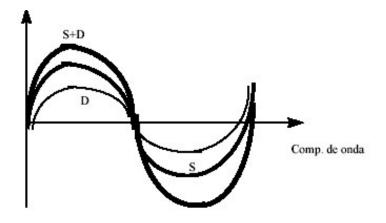
traduzir na produção de diferenças de cor ou de intensidade luminosa na imagem do objeto, que podem ser percebidas pelo olho humano.

MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

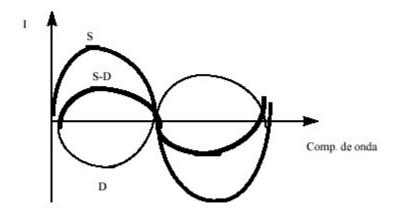
Ambos os microscópios usam a propriedade de dar contraste a estruturas biológicas transparentes à luz visível, visto que fazem mudanças de fase e/ou atrasos nas radiações que atravessam essas estruturas.

O microscópio de contraste de fase usa um condensador e objetivas especiais. O condensador está provido de um diafragma em forma de anel (diafragma anular) que produz um cone oco da luz que o atravessa.

A luz ilumina o objeto e o que o rodeia. A luz que passa o objeto é desviada em relação à que passa diretamente o meio que o rodeia. O efeito de fase depende da interferência entre a imagem geométrica direta e a imagem difratada lateral. Se os dois grupos de raios se somam em contraste brilhante ou negativo o objeto aparecerá mais brilhante que o meio. Quando o contraste é positivo ou escuro os jogos de raios experimentam uma interferência subtrativa sendo a imagem do objeto mais escura que o meio. Deste modo, pequenas mudanças de fase são transformadas em diferenças de amplitude (intensidade).

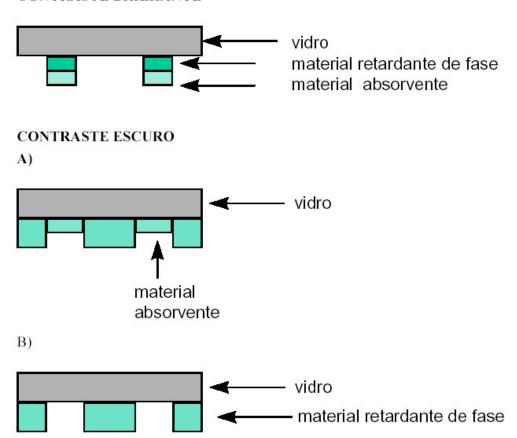


- D. Raios difractados
- S. Raios directos



Para obter os dois tipos de contrastes o microscópio é provido de objetivas com dispositivos de fase específicos:

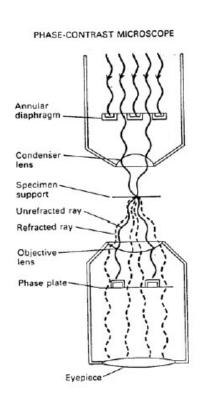
CONTRASTE BRILHANTE

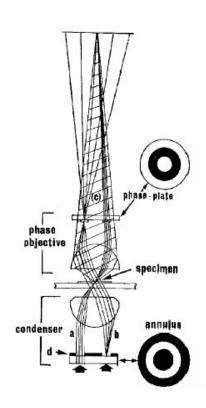


Conforme os fabricantes de microscópios o contraste escuro pode ser obtido com dois dispositivos diferentes (ver Figuras A e B). Utilizando o dispositivo A, a luz direta é

levada ao foco da objetiva onde está colocada à placa de fase. Esta, tem uma ranhura em forma de anel que é coberta por uma fina camada de metal que tem por fim fazer avançar os sados comparativamente à luz da da do objecto.

Os esquemas mostram a passagem da luz através da preparação, e os dispositivos de fase. Os esquemas mostram a passagem da luz através da preparação, e os dispositivos de fase.





A microscopia de interferência tem por base princípios semelhantes ao microscópio de contraste de fase, mas tem a vantagem de fornecer dados quantitativos. Este microscópio permite a detecção de variações pequenas e contínuas de índice de refração, enquanto que objeto, e porque o aumento refrativo é quase o mesmo para todas as moléculas o microscópio de fase só revela variações acentuadas.

Porque o atraso de fase é conseqüente da diferença entre o índice de refração do meio e do biológicas, é possível avaliar a quantidade de massa seca por unidade de área do objeto, medindo o atraso de fase.

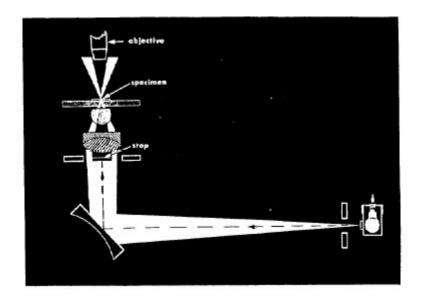
A quantificação do atraso de fase é feita usando um compensador que reduz o brilho do objeção a negro. Embora o seu uso seja remoto, pode ser empregue no futuro com sistemas analisadores de imagem.

MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO

No microscópio de fundo escuro, a luz é dirigida do condensador à amostra num ângulo oblíquo de maneira a que nenhuma luz incidente entre nas lentes da objetiva (criando um campo escuro se nenhuma amostra estiver presente). Nestas condições, só a luz refratada ou difratada pela amostra entra nas lentes da objetiva para formar a imagem.

A resolução não é muito boa, mas com este método podemos observar objetos pequenos que refratam a luz incidente. É usado na microbiologia, para detectar bactérias ou na auto-radiografia, para detectar grãos de prata produzidos na emulsão fotográfica por radiação.

A Figura mostra um esquema deste tipo de microscópio.



Uma das grandes vantagens dos microscópios de contraste de fase, interferência e de fundo escuro é que eles tornam possível a observação dos movimentos envolvidos em processos como, mitose e migração celular. Como muitos movimentos são demasiado

lentos para observar em tempo real é útil fotografar (*microcinematografia*) ou filmar em sistema de vídeo.

Ultimamente, as câmaras de vídeo e a tecnologia associada do processamento de imagem têm tido maior impacto na microscopia óptica. Além de possibilitarem a resolução de certas imperfeições do microscópio, resolveram de igual modo as limitações do olho humano, tais como a percepção de pequenas diferenças na intensidade da luz contra um fundo brilhante.

Como as imagens dadas pelas câmaras de vídeo são em forma eletrônica, elas podem ser digitalizadas e processadas por um computador. Este fato tornou possível, atingir o limite de resolução teórico do microscópio óptico e aumentar o contraste das imagens. Um dos exemplos é a observação de microtúbulos, com diâmetros de dimensão inferior ao $\ddot{\rm e}$ da luz (0,025 μ m) no microscópio de interferência assistido por um computador.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

É um microscópio de luz incidente (epi-iluminação), como o microscópio de reflexão. O feixe luminoso tem, no entanto um comprimento de onda apropriado (habitualmente na região azul ou ultravioleta) para **excitar substâncias fluorescentes** (fluorocromos) que se encontram na amostra. Estas substâncias podem fazer parte da composição natural amostra ou ser introduzidas pelo processamento técnico como corantes.

A luz emitida pelos fluorocrômos excitados pelo feixe luminoso entra na objetiva para formar a imagem.

Mecanismo da fluorescência

Quando certas substâncias como o vidro, gotas de gordura e diversos corantes são expostos às radiações UV, modificam o comprimento de onda destas radiações e tornam-se luminosas, isto é, são fluorescentes. Se tratarmos tecidos, células, bactérias com um corante

fluorescente e as examinarmos ao microscópio com luz UV, elas tornam-se luminosas e aparecem como corpos brilhantes num fundo escuro.

A fluorescência data de 1904 com Kohler e foi usada mais freqüentemente com Coons que introduziu a técnica dos anticorpos fluorescentes em 1941. A fluorescência é um fenômeno óptico no qual a luz é absorvida por uma substância chamada fluoroforo e quase instantaneamente re-emitida com luz dum ë maior. Como resultado da absorção da luz, as moléculas de fluoróforo tornam-se excitadas, quer dizer, absorvem a energia da luz e o seu estado eletrônico é mudado para um estado excitado no qual a energia de cada molécula é maior do que o seu estado normal.

A energia excedente é dissipada em calor, emitida em fluorescência, ou usada numa reação fotoquímica.

No primeiro caso, a luz é meramente absorvida sem fluorescência. No segundo, a

fluorescência ocorre. No terceiro, a reação fotoquímica induzida pela luz apagarse-á. Esta técnica não é só utilizada quando se pretende detectar substâncias em concentrações mínimas, mas também se usa para observações depois de tratamentos químicos. Quando surgem mudanças de excitação ou emissão do espectro de substâncias fluorescentes devido à sua união ao substrato, também se podem obter informações a respeito da conformação das moléculas do substrato.

Tipos de fluorescência do material biológico

Tipos de fluorescência	Locais e Técnicas
Autofluorescência	Fluorescência natural de substância(s) no tecido
	Drogas fluorescentes
Fluorescência induzida	Substância no tecido convertida a
	fluorófero
Fluorescência do corante	A.Téc.coloração simples sem p. trat.
	Químico
	B. Reac. química seguida de coloração, ex.
	Feulgen
Imunofluorescência	Fluorocromia indirecta
Fluorescência prod. Enzimaticamente	Mét. Fluorescentes

No

Quadro, podem ver-se os tipos de fluorescência e os materiais a observar no microscópio de fluorescência.

Autofluorescência

A autofluorescência é predominante nos tecidos vegetais. Nos tecidos animais, podemos encontrá-la nas fibras do tecido conjuntivo (colágeno e elastina) e nas lipofucsinas. No interior celular, a maior parte da autofluorescência é devida à presença do NADH unido a uma desidrogenase mitocondrial.

Todas as proteínas fluorescem quando são excitadas a 250-280 nm (UV), devido à presença do triptofano, tirosina e fenilalanina.

As gotas lipídicas também podem ser observadas no microscópio de fluorescência.

Fluorescência induzida

Algumas substâncias podem ser convertidas a fluorescentes por tratamento químico. Ex^{ϱ} o formol reage com as ariletilaminas por reações de condensação levando à formação de isoquinolinas e outros compostos fluorescentes.

Fluorocromia

Os corantes fluorescentes são conhecidos por fluorocromos em contraste com os que são visualizados no microscópio de luz que são chamados diacromos. Muitos corantes podem ser usados como diacromos e fluorocromos: Vermelho Congo, Vermelho neutro, Eosina e Fucsina Básica. A maioria dos corantes amarelos, laranja, e vermelhos são de fato, fluorescentes, (laranja de acridina e quinacrina, estão entre eles).

A coloração do DNA com fluorocromos é importante, principalmente, devido aos estudos

fluorimétricos. Primeiro, foi usada para o estudo da conformação do DNA, mas agora é utilizada para a quantificação do conteúdo em DNA. Usam-se Laranja de Acridina, reação de Feulgen, Brometo de etídio, etc.

Fluorescência Metacromática

Alguns fluorocromos são metacromáticos, isto é, fluorescem com mais de uma cor. Com os fluorocromos metacromáticos, assim como os diacromos, a mudança da ortocromasia para metacromasia envolve um aumento no pico de excitação (absorção) em direção a curtos comprimentos de onda, e um decréscimo na absorção máxima. Adicionalmente, existe um correspondente aumento do espectro de emissão em direção a grandes ë. Resumindo, a cor emitida pela fluorescência muda para uma de ë maior, e o brilho da fluorescência diminui.

A fluorescência metacromática é devida à formação de dímeros e polímeros como resultado duma agregação das moléculas do corante.

Dos corantes fluorescentes metacromáticos, o mais conhecido é a Laranja de Acridina, verde na sua forma ortocromática, cora o DNA, e vermelho na forma metacromática, cora o RNA, DNA desnaturado e polissacarídeos.

Imunofluorescência

Certos corantes fluorescentes podem utilizar-se para marcar os anticorpos do soro. Eles são adicionados às gamaglobulinas à custa de determinados radicais e tornam fluorescente o conjugado resultante. Pode empregar-se o isotiocianato de fluoresceína.

As figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, as estruturas da fluoresceína e tetrametilrodamina, dois corantes usados em imunofluorescência. O 1º emite luz amarela esverdeada quando é ativado por luz de comprimentos de onda próprios, enquanto que o 2º emite luz vermelha. Na zona sombreada é onde estão localizadas os grupos reativos quimicamente. Nesta posição vai ser formada uma ligação covalente entre o corante e a proteína ou outra molécula. Quando se ligam a proteínas a ligação é feita ao grupo SH ou ao NH2.

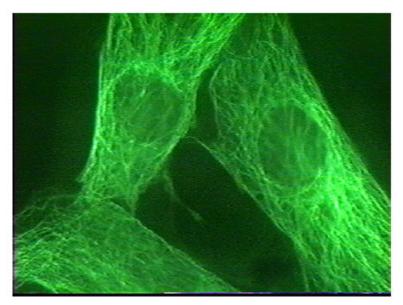
Fig.1 - Fluoresceína

Fig. 2 - Tetrametilrodamina

Fluorescência produzida enzimaticamente

A atividade enzimática nas células (vivas ou fixadas) pode ser estudada em sistemas onde a enzima produz uma mudança de fluorescência pela ação num substrato ou co-enzima.

Microtubúlos



Rat aortic smooth muscle cells stained with an anti-tubulin antibody and FITC-conjugated secondary antibody (green). (Omega Optical Filter Set # XF71). hotograph by Jim San Fillipo

Aplicações

As técnicas de fluorescência podem ser aplicadas a todas as espécies de material biológico.

O microscópio de fluorescência tem grande sensibilidade tornando possível detectar pequenas quantidades de substância ou partículas de tamanhos abaixo da resolução do microscópio de luz. Podem ser visualizadas as mesmas preparações que no MO de luz e tem a vantagem de observar os corantes que absorvem na região do UV fluorescendo no visível.

MICROSCOPIA DE POLARIZAÇÃO

Este método baseia-se no comportamento de certos componentes de células e tecidos, quando são observados com luz polarizada. Se o material for isotrópico, a luz polarizada propaga-se através dele com a mesma velocidade, independentemente da direção do plano de incidência. Estas substâncias caracterizam-se por terem o mesmo índice de refração em todas as direções. Por outro lado, num material anisotrópico a velocidade de propagação da luz polarizada varia. Este material também é chamado birrefringente, porque

apresenta dois índices de refração diferentes, correspondentes a diferentes velocidades de transmissão.

Nas fibras biológicas, a birrefringência é positiva se o índice de refração for maior ao longo do comprimento da fibra, do que no plano perpendicular, e é negativa no caso oposto.

A birrefringência (B) pode ser expressa quantitativamente como a diferença entre os dois índices de refração (N_e – N_0) associados com os raios de maior e menor velocidade.

Na prática, com o microscópio de polarização, mede-se o atraso (T) que a luz sofre num plano, relativamente à velocidade que a luz apresenta num plano perpendicular a este. O atraso está relacionado com a espessura do espécime (t) da seguinte maneira:

$$B = N_e - N_0 = T/t$$

O microscópio de polarização difere do microscópio vulgar pela presença de dois elementos de polarização: o polarizador e o analisador, que consistem de folhas Polaroid ou de prismas de Nicol em calcita. O polarizador monta-se por baixo do condensador e o analisador por cima da objetiva.

O microscópio de polarização, tal como o microscópio de interferência, pode ser acoplado a uma câmara de vídeo, o que melhora consideravelmente o contraste e a qualidade de imagem.

Microscópio confocal

Trata-se de um microscópio óptico que funciona em modo de varredura. Portanto o feixe luminoso irradia apenas um ponto da preparação, sendo produzido por um laser. Do mesmo modo que no MEV, o feixe de radiação percorre a preparação.

Microscópio invertido

É um microscópio óptico de transmissão, em que as posições da objetiva e do condensador se encontram invertidas relativamente à platina.

O aparelho é usado para observar o fundo dos frascos de cultura de células, que não podem ser facilmente estudados com os microscópios normais.

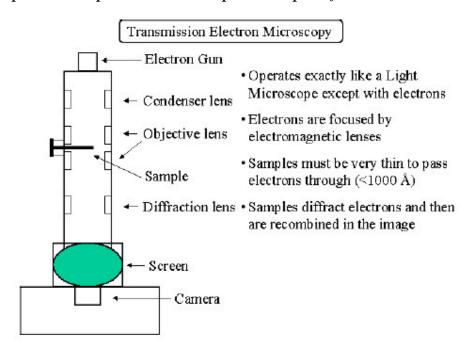
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

Interpretação da imagem em microscopia eletrônica de transmissão

As imagens observadas com um microscópio eletrônico de transmissão (TEM —).

(Transmission Electron Microscope) são imagens de cortes de objetos tridimensionais. A formação das imagens no microscópio depende de métodos de contrastação que introduzem nos cortes metais pesados que, ao interagir com o feixe de elétrons, dão origem à imagem. Na interpretação destas imagens há que atender, portanto a estes dois fatores:

1. Em que medida é que a imagem produzida pelo método de contrastação corresponde à realidade estrutural, e que dados sobre a sua composição química se podem recolher por manipulação dos mecanismos de contrastação.



2. Que se pode inferir relativamente à estrutura do objeto tridimensional que se pretende compreender, do estudo das secções bidimensionais, em termos qualitativos e quantitativos.

O contraste

Para compreender a primeira questão é necessário conhecer o mecanismo da formação do contraste no TEM. O feixe de elétrons, acelerado por um potencial

de várias dezenas de kilovolts (tipicamente 60-80 KV em estudos de materiais biológicos), atravessa a amostra interagindo com os seus átomos.

As colisões dos eletros do feixe com os átomos da amostra processam-se segundo dois processos essenciais:

- 1) colisões dos elétrons do feixe com os elétrons dos átomos da amostra.
- 2) colisões com os respectivos núcleos.

No primeiro caso, o electron do feixe transmite parte da sua energia ao electron do átomo da amostra e é pouco desviado da sua trajetória. Trata-se de uma colisão não elástica. Estas colisões reduzem a energia dos elétrons do feixe, que podem produzir contraste por interfência com os elétrons do feixe que não sofreram colisões. Este mecanismo de formação do contraste tem importância sobretudo para o detalhe mais fino, perto do limite de resolução do microscópio. No segundo caso, os elétrons do feixe não perdem energia, mas são desviados da sua trajetória segundo ângulos elevados, quando colidem com núcleos de átomos pesados.

Estes elétrons podem ser seletivamente removidos pela introdução de diafragmas que só deixam passar os elétrons não desviados (fig). Consequentemente, nas regiões da amostra onde há maior concentração de átomos pesados, há uma maior fração de elétrons desviados e removidos do feixe, gerando regiões deficientes em elétrons.

Microscopia eletrônica de varredura

Enquanto que nos microscópios de transmissão convencionais o feixe irradia toda a amostra, e são as alterações produzidas no feixe por interação com esta que vão ser convertidas na imagem, nos microscópios de varredura o feixe irradia apenas um ponto da amostra. O feixe percorre sistematicamente toda a amostra por um processo de varredura, e a interação do feixe com a amostra gera sinais que podem ser medidos por detectores apropriados. A imagem forma-se ponto por ponto em tubos de raios catódicos nos quais o feixe de elétrons se move de um modo sincronizado com o movimento do feixe de radiação do microscópio de modo que a cada ponto do objeto corresponde um ponto da imagem. A intensidade e/ou cor do ponto imagem são moduladas pelo

sinal recolhido pelo detector. A resolução deste tipo de aparelhos depende principalmente do tamanho da área do objeto irradiada pelo feixe O modo de varredura pode ser implementado quer em microscopia de transmissão quer em microscopia de reflexão quer óptica quer eletrônica. As implementações atualmente mais importantes em biologia são o microscópio eletrônico de varredura (MEV –).

scanning electron microscope), que é essencialmente um microscópio eletrônico de reflexão, e o microscópio confocal, que é um microscópio óptico funcionando também em modo de reflexão (fazendo uso principalmente de técnicas de imunofluorescência). Merece também referência o microscópio eletrônico de varredura-transmissão (STEM – Scanning-transmission electron microscope) que é um microscópio eletrônico funcionando em modo de transmissão.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV

Funcionamento do instrumento

No microscópio eletrônico de varredura o feixe de radiação é um feixe de elétrons que é focado num ponto da amostra pelas lentes eletromagnéticas do microscópio. A interação do feixe de elétrons com a amostra gera um conjunto de sinais em que se contam elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, raios-X, etc. Estes sinais podem ser medidos por detectores apropriados, respectivamente para elétrons de baixa energia (elétrons secundários), de alta energia (elétrons retrodifundidos), e raios-X. Estes sinais são convertidos pelo detector em correntes elétricas de maior ou menor intensidade que vão modular a intensidade do feixe de elétrons que forma a imagem no tubo de raios catódicos. As amostras estudadas no MEV são amostras espessas, como dentes inteiros, não sendo importante que o feixe de elétrons seja capaz de a atravessar uma vez que os sinais recolhidos dizem respeito, em regra, apenas à iteração com a superfície da amostra. Portanto estes instrumentos estão particularmente adaptados ao estudo das superfícies das amostras e não da estrutura interior.

Preparação das amostras para o MEV

Uma vez que interessa estudar a superfície de amostras inteiras, os métodos de preparação têm por objetivo preservar as superfícies, de um modo tão fiel quanto possível. Quando se torna necessário estudar o interior das amostras,

estas podem ser cortadas ou fraturadas de modo a expor o interior. Como as amostras são observadas no vácuo do microscópio, elas têm de ser fixadas e secas. secagem é habitualmente o passo mais delicado, uma vez que no seu decurso, os fenômenos de tensão superficial exercem forças capazes de destruir a maior parte da estrutura biológica observável. Para evitar estes efeitos recorrese à secagem por métodos de ponto crítico ou a partir de líquidos de tensão superficial muito baixa.

Modernamente têm vindo a ser desenvolvidos microscópios eletrônicos de varredura "ambientais" nos quais a câmara que contém a amostra pode ser mantida a uma pressão elevada, próxima da pressão atmosférica, permitindo a observação de amostras não desidratadas.

Imagens produzidas pelos elétrons secundários

Trata-se do modo de observação mais utilizado no MEV. Os elétrons secundários são os elétrons ejetados dos átomos da amostra pelas colisões não elásticas com os elétrons do feixe. Estes elétrons são ejetados direcionalmente em função da topografia da amostra.

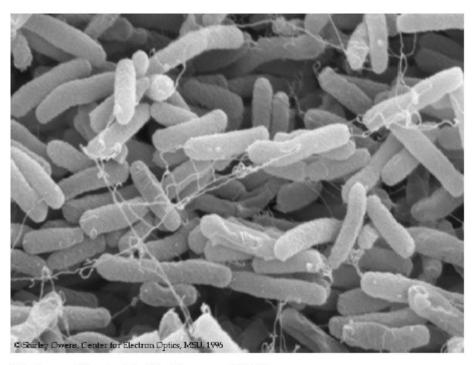
A intensidade da emissão depende da natureza química da amostra. Os metais, que possuem elétrons mais fracamente ligados, emitem melhor que as substâncias em que os elétrons se ligam mais firmemente aos átomos, caso dos compostos orgânicos. Por este motivo, a superfície das amostras é recoberta com finas películas metálicas. Como o detector se localiza num dos lados da câmara de observação, a intensidade do sinal recolhido é maior para os pontos das superfícies viradas para o detector. Por este motivo, o método é ideal para revelar a topografia das superfícies.

Imagens produzidas pelos elétrons retrodifundidos

Estes elétrons são os elétrons do feixe que, através de sucessivas colisões elásticas com os átomos da amostra são desviados do seu trajeto o suficiente para se libertar da amostra e re-entrar no vácuo da câmara de observação (retro-difusão). Como se trata de elétrons do feixe de radiação do microscópio, desviados por colisões elásticas, a sua energia é muito maior que a dos elétrons secundários. A sua emissão é também direcional como a dos elétrons secundários. No entanto trata-se de elétrons que penetram na amostra a maior

profundidade e que são defletidos mais intensamente nas regiões de maior densidade de massa (à semelhança do que se passa no mecanismo de formação de contraste do TEM).

Portanto, a intensidade do sinal reflete não apenas a topografia da amostra como a sua composição química.



Fotografia de E. Coli num SEM

	,				
ROTEIRO	PRATI	CO DE	RIOL	OCIA	N_{-}°

Prof.: Data:	///
--------------	-----

Tema: Observação do Microscópio Óptico Comum (M.O.C.)

Material: Microscópio, lâminas prontas.

Construção do Microscópio óptico

O microscópio é um aparelho destinado a ampliar a imagem das micro estruturas observadas, utilizando para isso, a luz.

- 1. *Base* ou *p*é: dá ao instrumento boa estabilidade e é usado para o repouso do aparelho na mesa de trabalho. Nele está um botão que dá controle à intensidade luminosa.
- 2. Braço: sustenta a parte óptica (lentes) e serve para o transporte do aparelho.
- 3. *Tubo* ou *canh*ão: contém em uma das extremidades a lente e na outra, o revólver que é uma peça giratória a qual se prendem as lentes objetivas.
- 4. *Platina:* sobre esta se coloca a lâmina preparada, exatamente sobre uma abertura central que dá passagem aos raios de luz.
- 5. Charriot: serve para locomover a lâmina para a direita ou esquerda e para cima ou para baixo.

- 6. *Parafuso* macro *e* microm*étrico*: abaixam e elevam a platina. O micrométrico permite um ajuste grosseiro da imagem. O micro permite uma melhor focalização.
- 7. Revólver: local onde são inseridas as objetivas.
- 8. *Objetivas:* Conjunto de lentes que ampliam a imagem. Estão presas ao revólver, que ao ser girado vai mudando as objetivas. Ela projeta uma imagem real, ampliada e invertida. O aumento da objetiva é gravado na sua lateral. Para uso da objetiva de imersão (100 x) utilizar, inicialmente, o menor aumento e focalizar. Colocar então uma gota de óleo de cedro sobre o centro iluminado da lâmina lateralmente e controlando o abaixamento até que a objetiva toque o óleo. Observar pela ocular e girar o micro até que a focalização seja nítida. Terminando o estudo, limpar a lâmina e a lente usando um pano macio molhado em xilol, em seguida com flanela limpa.
- 9. *Ocular*: Conjunto de lentes sobre as quais você coloca o olho. Dá imagem virtual, ampliada e direta. O aumento está gravado na sua extremidade superior. Para cálculo da ampliação total, multiplica-se a ampliação da ocular pela da objetiva. Exemplo: ocular = 10x e objetiva = 40x --- ampliação total de 400x.
- 10. Condensador: está por baixo da platina. É o conjunto de lentes cuja função é concentrar a luz.
- 11. Lâmpada

Recomendações

O M.O.C. deve ser transportado cuidadosamente com as duas mãos, pelo braco e pela base.

Após o uso, o microscópio deve ser guardado livre de poeira e/ou óleo. Sempre com a menor objetiva e a platina totalmente levantada.

Como utilizar o microscópio

- 1. Coloque a lâmina com o material a ser observado no orifício da platina.
- 2. Gire o botão que está no pé do microscópio e dê a intensidade luminosa. Não precisa girar até o fim e não force o botão.
- 3. Olhando por fora e nunca pela ocular, e com a objetiva de menor capacidade gire o parafuso macrométrico, até que a objetiva se aproxime da lâmina.

4. Com os olhos na ocular, gire o macro no sentido inverso, bem devagar até ver o material no campo com relativa nitidez.

- 5. Focalize melhor com o micro, para conseguir uma boa imagem. Para uma ampliação maior, gire o revólver e utilize imediatamente uma objetiva mais poderosa. Corrija o foco com o micrométrico. Cada vez que mudar a objetiva, repita essa operação.
- 6. Para pessoas destras, a mão esquerda deve estar presa ao macro e a direita livre para desenhar, escrever, etc.

Unidades de Medida

O estudo das estruturas celulares exige a utilização de medidas adequadas ao material estudado. Na tabela seguinte, fornecemos algumas dessas dimensões.

Unidade	Símbolo	Referência	Dimensões citológicas	
milímetro	mm	0,001	vista desarmada	
IIIIIIIeuo	111111	metros	tecidos, células grandes	
			microscopia óptica	
micrômetro	m-	0,001 mm	maioria das células e	
		organelas maiores		
nonâmotro		0.001 m	microscopia eletrônica	
nanômetro nm 0,001 m-		organelas menores		

8	å	0.1	microscopia eletrônica	
ångströn	A	0,1 nm	moléculas.	

O olho humano é capaz de distinguir dois pontos distantes 0,1 mm um do outro. Se a distância for menor, eles serão vistos como um ponto apenas. A capacidade de distinguir dois pontos muito próximos é chamada poder de resolução. O poder de resolução de um microscópio óptico é de cerca de 225 nm e do eletrônico é de até 0,5 nm

Procedimento

- 1. Reconheça cada peça do microscópio, colocando os nomes de suas partes.
- 2. Utilize uma lâmina fornecida pelo professor para ter o mecanismo de focalização em 40x, 100x e 400x. Não precisa esquematizar.

	,		
ROTEIRO	PRATICO	DE BIOL	OGIA N.º .

Prof.: Da	ata:/	·	'
-----------	-------	---	-------

Tema: Utilização do Microscópio Óptico Comum (M.O.C.)

Material: M.O.C., lâminas, lamínulas, letras recortadas de jornal, água e papel de filtro.

Procedimento: Limpe bem a lâmina, coloque a letra, duas gotas de água e a lamínula por cima.

Observações:

Para evitar a formação de bolhas de ar, coloque a lamínula com o polegar e indicador da mão direita de maneira a formar um ângulo entre lâmina e lamínula de 45°. Deixe a lamínula cair sobre a letra de uma só vez. Enxugue o excesso de água com papel de filtro.

Esta aula tem como objetivo exercitá-lo para o uso do M.O.C. bem como provar o que foi dito no roteiro anterior sobre as objetivas. Portanto, se você enxergar a imagem invertida, desenhe-a como a vê.

AULAS PRÁTICAS BIOLOGIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE Professores: Dr. NewtonSoares da Silva e Dra. Cristina Pacheco-Soares

31

Esquematizar: a letra em aumento de 40x, 100x e 400x. Atente para as sensíveis diferenças de detalhes. Não se esqueça que isso é um trabalho científico, por isso, merece uma boa observação e um bom relato.

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º

Nome:	 N.°:	Turma:
Prof.:	Data:	/

Tema: Diversidade Celular

Os antigos filósofos e naturalistas chegaram à conclusão de que "todos os animais e vegetais, por mais complicados que fossem, eram constituídos por uns poucos elementos que se repetiam em cada um deles". Referiam-se às estruturas macroscópicas de um organismo, tais como as raízes, os caules ou os segmentos de órgãos que se repetem no mundo animal. Muitos séculos mais tarde, graças ao invento e posterior aperfeiçoamento dos microscópios, foi descoberto que por detrás desta estrutura macroscópica, existe também um mundo de dimensões microscópicas.

As células são as unidades estruturais e funcionais dos seres vivos. Apesar da grande diversidade existente entre os seres vivos consideram-se apenas dois tipos celulares básicos: as células procariotas e as eucariotas. As células procariotas apresentam menores dimensões e caracterizam-se por não possuírem um sistema de membranas que divida a célula em compartimentos funcionais. Nestas o genoma está em contacto direto com a porção plasmática.

As células eucariotas apresentam-se divididas em compartimentos funcionais graças à presença de um complexo sistema de membranas. Os principais componentes das células

eucariotas são o núcleo, o invólucro nuclear, o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi, os lisossomas, as mitocôndrias e, nas células vegetais, os cloroplastos.

Atendendo à diversidade existente entre os seres vivos, desde muito cedo houve a preocupação de os classificar em grupos de identidade. O sistema de classificação de cinco Reinos foi proposto por Whittaker em 1969, baseando-se não só nos diferentes níveis de organização celular, mas também nos principais tipos de nutrição. Assim, enquanto o Reino *Monera* inclui o nível de organização procariótico, o Reino *Protista* corresponde ao nível eucariótico unicelular e os Reinos *Planta*e, *Fungi* e *Animalia* traduzem o nível eucariótico e multicelular.

2. MATERIAL

- Microscópio Infusão de palha
- Lâminas e lamínulas *Tradescantia* sp.
- Lâminas escavadas Cebola
- Pinças e bisturis Preparações definitivas de bactérias
- Azul de metileno Iogurte
- Varetas de vidro Óleo de imersão
- Lamparina

3. TÉCNICA

3.1 - Observação de células da epiderme do bulbo da cebola (Allium cepa L.)

- 1. Retire com uma pinça, uma porção da epiderme interna de uma escama do bolbo da cebola.
- 2. Coloque-a sobre uma lâmina com uma gota de água.
- 3. Cubra com lamínula.
- 4. Observe ao microscópio e registe.
- 5. Deite uma ou duas gotas de azul de metileno ao longo de um dos bordos da lamínula. Com papel de filtro, aspire na margem oposta até à infiltração do corante.
- 6. Observe ao microscópio e registe.

3.2 - Observação de células da epiderme do caule de Tradescantia sp.

- 1. Corte um fragmento de caule com cerca de 3 cm.
- 2. Com a ajuda de uma pinça retire uma porção da película epidérmica.
- 3. Coloque-a sobre uma lâmina com cuidado por forma a não dobrar.
- 4. Adicione uma gota de água.
- 5. Coloque a lamínula.
- 6. Observe e registe.

3.3 - Observação de células do epitélio bucal

- 1. Desinfete o dedo indicador com álcool.
- 2. Raspe a parte interna da bochecha com a ponta do dedo.
- 3. Esfregue a ponta do dedo numa lâmina e cubra-a com a lamínula.
- 4. Observe ao microscópio.
- 5. Deite uma ou duas gotas de azul de metileno ao longo de um dos bordos da lamínula. Com papel de filtro, aspire na margem oposta até à infiltração do corante.
- 6. Observe ao microscópio e registe.

3.4 - Observação de bactérias do iogurte

- 1. Coloque um pouco de iogurte sobre uma lâmina com o auxílio de uma vareta de vidro.
- 2. Passe a lâmina três ou quatro vezes sobre a chama da lamparina. Deixe arrefecer.
- 3. Deite uma ou duas gotas de azul de metileno e deixe atuar durante alguns minutos.
- 4. Lave a lâmina com água destilada e deixe secar.
- 5. Coloque uma gota de óleo de imersão e cubra com lamínula
- 6. Observe e registe (utilize a objetiva de imersão 100 X colocando uma gota de óleo). (de imersão sobre a lamínula).

Nota: No final desta sessão deverá ficar completamente elucidado sobre o significado dos termos como células procariotas e eucariotas, seres unicelulares e pluricelulares, seres unicelulares procariotas e eucariotas, seres pluricelulares eucariotas, células animais e vegetais, entre outros, bem como ficar com uma visão global sobre a grande diversidade celular que constitui o mundo vivo.

	,		
DOTEIDO	DDATIC	O DE BIOI	OCTA NO
	FNAIN.		AMTIA IN.

P	rof.	·	 Data:	/

Tema: Observação de células vegetais.

Material: Elodea (planta aquática), lâmina, pinça, lamínula, conta-gotas, microscópio.

Procedimento:

- 1. Destaque uma folha inteira da planta, coloque-a no centro de uma lâmina bem limpa.
- 2. Pingue uma gota de água sobre a folha, então a lamínula por cima sem deixar bolhas (vide aula "Utilização do M.O.C.)".
- 3. Focalize em 40x, 100x e 400x.
- 4. Note as células, seu formato, tamanho, membranas, cloroplastos.
- 5. Observe o movimento dos cloroplastos. O movimento realizado pelos orgânulos e hialoplasma é uma das propriedades do citoplasma que recebe o nome de ciclose.

Esquematizar: Desenhe em	100x e 40	0x. No caso	de dúvidas,	solicite o	professor.
--------------------------	-----------	-------------	-------------	------------	------------

	,			
ROTEIRO	PRATICO	DE BIOL	OGIA	N.º

Prof.: Data:	/
--------------	---

Tema: Dissociação do epitélio da mucosa oral.

Material: espátulas, lâminas, lamínula, azul de metileno, conta-gotas.

Procedimento:

- 1. Com uma espátula especial, raspe a mucosa de dentro da bochecha.
- 2. Espalhe o material sobre o centro da lâmina.
- 3. Acrescente uma gota de azul de metileno.
- 4. Coloque a lamínula (siga a mesma técnica da aula anterior).

Esquematizar:

Você vai fazer esquemas nos círculos correspondentes em 100x e 400x. Não esquecer de colocar legendas. Seu desenho deve se aproximar o máximo do real. Não desenhe o que você não vê.

AULAS PRÁTICAS BIOLOGIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE Professores: Dr. NewtonSoares da Silva e Dra. Cristina Pacheco-Soares

36

Observações:

Você notará a presença de células epiteliais vistas de perfil, frente, isoladas e aglomeradas. Em todas, é possível identificar o núcleo como uma pequena esfera intensamente corada em azul de

posição central. O citoplasma apresenta-se corado de azul mais claro e com presença de

minúsculas granulações. Quando você for esquematizar, procure um grupo de células onde você

possa isolar algumas para poder observar bem os detalhes citados acima.

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º

Nome:	N	0	•	Turmo	
NOIDE		١.		i ui iiia	

Prof.: Data:/

Tema: Observação dos componentes em célula vegetal viva.

Material: Cebola, vermelho neutro, gilete, vidro de relógio, pinça, água destilada, bequer, lâmina,

lamínula, óleo de imersão, M.O.C.

Procedimento:

1. Cortar longitudinalmente uma cebola.

2. Separar uma das camadas internas.

3. Retirar a epiderme externa (película que envolve a camada).

4. Dividir a epiderme em 4 pedaços quadrados de mais ou menos 3 mm de lado.

5. Mergulhar os cortes em 1 ml de solução de vermelho neutro contido em um vidro de relógio.

6. Passando um minuto, com a pinça, retirar um dos pedaços da epiderme.

7. Lave-o em água destilada dentro do béquer.

8. Colocá-lo entre lâmina e lamínula.

9. Observe em 400x.

10. Passados cinco, dez e quinze minutos, observar, sucessivamente os cortes.

Esquematizar: Desenhe em 1000x os 4 cortes. Responda as questões.

α 1	~
Incor	vacan•
Obser	rucuo.

- * Corantes vitais são utilizados para observação de células vivas.
- * Neste relatório você poderá identificar parede celular, citoplasma, vacúolo e núcleo.

Responda:

1. Ocorreu mudanças de cor em diferentes partes da célula? Por quê?	
2. O tempo de imersão no corante teve algum efeito na distribuição da intensidade da o	or?

	,			
ROTEIRO	PRÁTICO	DE BIOL	OGIA	N.º

Nome:	N.°:	Turma:
Prof.:	Data:	/

Tema: Observação de vacúolo e leucoplastos.

Material: Folha de Zebrina pêndula, lâmina, lamínula, conta-gotas, água e M.O.C.

Procedimento:

- 1. Retire a epiderme inferior de uma folha de Zebrina e coloque-a numa lâmina com 1 (uma) gota de água. Cubra com a lamínula.
- 2. Observe e esquematize utilizando as objetivas de 40x e 400x.

Observação:

Nas células de raízes de plantas, por exemplo, as moléculas de glicose provenientes das folhas (sede da fotossíntese) penetram nos leucoplastos, onde se transformam em amido.

Os leucoplastos repletos de amido passam a ser chamados de amiloplastos ou de grãos de amido. Sua função é servir de organela armazenadora de alimento para situações de necessidade.

Responda:

Em que essas células diferem das células já observadas?	
ı J	

3. Faça uma tabela comparativa das estruturas de uma célula animal e vegetal e assinale com (X) quando a estrutura estiver presente .

Nome das estruturas	célula animal	célula vegetal
1-		
2 -		
3-		
4-		
5-		
etc		

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º .
Nome: N.°: Turma:
Prof.: Data:/
Tema: Observação de células de Elódea
Material: Folha de elódea, lâmina, lamínula, conta-gotas, lugol, microscópio
Procedimento:
1. Tome uma folha nova de elódea do ápice do ramo, e coloque-a numa lâmina.
2. Core com Lugol, espere alguns minutos
3. Observe no microscópio com aumento de 40x a 400x.
Que estruturas tornam-se visíveis nas células coradas?

Essas células têm vacúolo? Em que você se baseia para responder?

) que limita as células de cebola, elódea e zebrina?	
Há diferenças entre o núcleo dessas células e os núcleos das células da cebola e ze	ebrina?
Há nucléolo nos núcleos das células dos três materiais?	
ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º	
Prof.: Data:/	

Tema: Movimento da água através da membrana.

Material: Ramo de Elódea, água destilada, 5 g de sal em 100 ml de água (5%), lâmina, lamínula, papel de filtro, microscópio.

Procedimento:

- 1. Retire uma folha jovem de elódea (da ponta onde há crescimento).
- 2. Coloque sobre uma lâmina com uma gota de água e cubra com a lamínula.
- 3. Observe a folha em aumento de 40x, focalizando próximo à nervura central, coloque em 400x e desenhe a célula.
- 4. Pingue uma gota de solução salina a 5% em um dos lados da lamínula e absorva com papel de filtro no lado oposto. Observe pela ocular o que acontece às células. Aguarde alguns minutos e desenhe a célula nesta situação.
- 5. Repita o experimento usando água destilada no lugar da solução.
- 6. Aguarde e desenhe.

Responda:

1. Quando a folha de elódea está em solução salina, qual é o movimento da água?	
2. Quando em água destilada, qual o sentido do movimento da água?	
3. Explique as modificações observadas usando os termos hipotônica, hipertônica e	e osmose.
4. Certas conservas são feitas com salmoura. Você é capaz de explicar por que não	o ocorre ataque
dos microorganismos nesses alimentos?	

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º					
Prof.:	Data:	/			

Tema: Prova de Permeabilidade seletiva na membrana.

Material: Suspensão de levedo em água, solução de vermelho congo, formol a 40%, 3 tubos de ensaio, e lâmina, conta-gotas, pinça de madeira, bico de bunsen, M.O.C.

Procedimento

- 1. Colocar 2 ml de suspensão de levedo em cada um dos 3 tubos de ensaio.
- 2. Adicionar seis gotas de vermelho congo em cada um dos 3 tubos.
- 3. Somente no segundo adicionar 8 gotas de formol.
- 4. Somente o terceiro levar à chama do bico de bunsen até ferver.
- 5. Preparar 3 lâminas com uma gota do material sendo uma para cada um dos tubos preparados.

Esquematizar: Observar em 400x cada lâmina.

AULAS PRÁTICAS BIOLOGIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE Professores: Dr. NewtonSoares da Silva e Dra. Cristina Pacheco-Soares

44

Responda:

1. O que é Permeabilidade seletiva da membrana plasmática?

2. Em que tubo houve mudança de coloração? Por quê?

3. Qual a influência do formol?

4. Antes de findar a aula, observe novamente o 1° tubo. Houve alguma mudança? Explique.

DOTTINO	DD (TICO	DE DIOI	OCTA	N T A	
ROTEIRO	PRATICO	DE RIOL	OGIA I	N.º	•••••

Prof.: Data:/

Tema: Permeabilidade Diferencial em Células Vivas

1. INTRODUÇÃO

A permeabilidade diferencial é fundamental para a fisiologia da célula e para a manutenção de condições fisiológicas intracelulares adequadas, pois condiciona a entrada de certas substâncias, muitas das quais são necessárias para manter os processos vitais e a síntese de novas substâncias vivas, para além de regular a saída de água e de produtos de excreção, que devem ser eliminados da célula.

Os estudos da permeabilidade são baseados na composição química e na organização molecular da membrana plasmática, a qual estabelece uma clara diferenciação entre o líquido intracelular e o extracelular, no qual a célula está imersa.

A membrana plasmática e de uma maneira geral todas as membranas celulares são constituídas por uma bicamada lipídica e por proteínas que apresentam uma organização vectorial (fig. 1). Os lípidios das membranas são moléculas anfipáticas com as regiões polares ou hidrófilas orientadas para as superfícies interna e externa, enquanto que as regiões apolares ou hidrófobas se localizam no interior das membranas. As membranas apresentam natureza fluída gozando as

moléculas protéicas de mobilidade lateral, no plano da membrana. As proteínas são os principais componentes funcionais das membranas celulares.

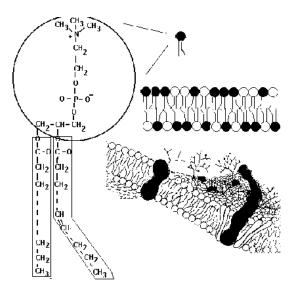


Fig. 1- Modelo de organização das membranas biológicas em "mosaico fluido".

2. MATERIAL

- Folhas de *Elodea* sp. Vermelho de Congo
- Lâminas Lamparinas
- Lamínulas Pinças
- Papel de filtro Copos de precipitação com água
- Solução de cloreto de sódio a 5% Vidro de relógio
- Suspensão de leveduras Tubos de ensaio

3. TÉCNICA

Exp.1

- 1. Coloque uma folha de *Elodea* sp. numa gota de água numa lâmina.
- 2. Coloque a lamínula e observe ao microscópio.
- 3. Coloque um pedaço de papel de filtro em contacto com uma aresta da lamínula.
- 4. Adicione na outra extremidade da lamínula uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 5%.

- 5. Observe ao microscópio e registe.
- 6. Retire a folha de *Elodea* sp. e coloque-a num copo de água durante 5 minutos.
- 7. Volte a observá-la ao microscópio e registe as alterações que observar.
- 8. Coloque agora a folha de *Elodea* sp. num vidro de relógio com uma solução de NaCl a 5% durante 15 minutos.
- 9. Retire a folha e coloque-a numa lâmina com uma gota da mesma solução.
- 10. Observe e registe.

Exp.2

- 1. Coloque 1 ml de uma suspensão de leveduras em dois tubos de ensaio.
- 2. Adicione três gotas de uma solução de vermelho de Congo a cada um dos tubos.
- 3. Aqueça até à fervura a solução de um dos tubos (faça esta operação com muito cuidado). para não deixar "espirrar" a solução).
- 4. Coloque uma gota de cada uma das soluções em duas lâminas e cubra com lamínula.
- 5. Observe ao microscópio e registe.

4. TÓPICOS DE DISCUSSÃO

Exp.1

- 1. Como explica as alterações registadas nas células da folha de *Elodea* até ao passo 4?
- 2. Como explica as alterações registadas no passo 6?
- 3. Como explica as alterações registadas nas células da folha da *Elodea* após 15 minutos na solução de cloreto de sódio a 5% ? (passo 9)

Exp.2

- 1. Que diferenças observou nas duas suspensões ?
- 2. Como explica esses resultados ?

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º

Nome:	. N.°:	Turma:
	_	
Prof.:	. Data:	/

Tema: Observação de estômatos

Material: Folhas de *Rhoeo ou Zebrina* (planta terrestre), pinça, lâmina, lamínula, conta-gotas, água destilada e solução salina.

Procedimento I:

- 1. Destaque uma folha, e retire com auxílio de pinça um delgado fragmento da epiderme inferior.
- 2. Coloque-a na lâmina limpa, pingue uma gota de água destilada e coloque a lamínula.

Esquematizar:

Desenhe em 400x. Responda as questões depois de ler as observações e ver o material no microscópio.

Observações:

Observe o contorno poligonal das células e o conteúdo avermelhado devido à antocianina. Atente para a disposição regular das células que no seu conjunto constituem o tecido epitelial de revestimento.

Os estômatos são estruturas da epiderme específica das folhas, responsáveis pelas trocas gasosas e transpiração. Cada estômato tem duas células guarda onde fica o ostíolo cuja abertura depende da turgescência celular.

Planta	Face inferior	Face superior
Cedrella	600	0
Ficus	145	0
Nymphaea (aquática)	0	460
Helianthus (girassol)	325	175
Zea (milho)	68	52

A tabela nos dá uma idéia do número médio de estômatos por mm2 de superfície da folha.

Mecanismos de *abertura* e *fechamento* dos *est*ômatos

Os estômatos permanecem abertos quando a folha está em presença de luz e há um bom suprimento de água. À noite, ou quando há deficiência de água, os estômatos se fecham..

Existe um mecanismo dependente do suprimento de água (hidroativo) e outro dependente da luz (fotoativo). Em qualquer caso, sabe-se que os estômatos abrem-se quando as células-guardas estão túrgidas, fechando-se quando elas perdem água.

Quando está túrgida, a célula-guarda fica arqueada devido ao reforço existente apenas na parede interna (voltada para o ostíolo). O aumento do volume da célula provoca a expansão da parede oposta ao ostíolo, o que puxa a parede interna pouco elástica, abrindo o estômato. A saída de água das células-guardas leva ao fechamento do estômato.

O mecanismo hidroativo é devido ao suprimento hídrico disponível, quando houver um bom suprimento os estômatos estarão abertos Se houver deficiência estarão fechados. Esse mecanismo protege o vegetal de uma transpiração excessiva, porém quando fechados à fotossíntese é prejudicada devido a maior dificuldade para absorção de gás carbônico.

O mecanismo fotoativo está ligado a fotossíntese. De todas as células da epiderme, as únicas que possuem cloroplastos são as células-guardas dos estômatos.

Quando a luz incide sobre as células-guardas, ocorre a realização de fotossíntese. Os cloroplastos presentes nessas células retiram o CO₂ dissolvido no suco celular, o que o torna mais alcalino (básico). Assim as enzimas transformam o amido (insolúvel) armazenado em glicose (solúvel), aumentando a concentração celular. Logo a célula-guarda passa a absorver água das células anexas vizinhas, aumentando seu volume e abrindo os estômatos.

No escuro ocorre a respiração celular, consequentemente há a eliminação de CO2 e o processo que ocorre é o contrário do citado acima, o que leva a diminuição da concentração das células-guardas e a perda de água para as células anexas vizinhas.

Procedimento II

- 1. Introduza uma gota de solução salina, encostando um papel de filtro do lado oposto. Observe ao microscópio e anote o que acontece.
- 2. Substitua a solução salina por água destilada. Observe e anote o que acontece.

Responda

1. Por que a solução salina muda o estado do estômato ? E a água destilada?
2. Se um vegetal se encontra num local que possui grande umidade no solo e na atmosfera, e bo iluminação, espera-se encontrar seus estômatos com ostíolos abertos ou fechados?
3. Explique com as suas palavras os fenômenos fotoativo e hidroativo dos estômatos.

4. No que o pH interfere nesse processo?	

	,			
ROTEIRO	PRATICO	DE RIOI	OGIA	N.º

Prof.: Data:/

Tema: Observação de mitocôndria em células vivas.

Material: Leveduras, lâmina, lamínula, verde janus, conta-gotas, óleo de imersão, , M.O.C.

Procedimento:

- 1. Preparar uma solução de leveduras (fermento de pão) e colocar uma gota sobre a lâmina
- 2. Colocar uma gota de verde janus,
- 4. Cobrir com a lamínula.

Esquematizar: Desenhar o conjunto de células, observe no aumento de 1000x. Responder as questões.

Observações:

As mitocôndrias são orgânulos citoplasmáticos importantíssimos (vide apostila de teoria ou livro).

Esta observação é feita com corante vital (não mata a célula) específico: o verde janus.

As mitocôndrias são muito pequenas e a observação de tais orgânulos é relativamente difícil e vai precisar de muito empenho e boa vontade. Esta aula é muito bonita. Vai valer a pena. Boa aula!

Responda:
1. Qual a função da mitocôndria?
2. Por que se utiliza o verde janus nessa prática?

				,	•				
D	n	TFI	\mathbf{p}	DD A	TICO	DEI	RINI	OGIA	N o
17			1717					NITIA	1.

Tema: Classificação dos cromossomos humanos e montagem do cariótipo.

Material: fotografia de cromossomos humanos em metáfase, tesoura, cola e lápis.

Procedimento:

- 1. Conte os cromossomos da página avulsa, fazendo um contorno em cada grupo de 10 cromossomos (aleatoriamente), deve sobrar alguns;
- 2. Anote o total de cromossomos encontrados
- 3. Os cromossomos são classificados de acordo com o tamanho e a morfologia, que está relacionada com a posição do centrômero, e estão divididos em 7 grupos representados de A a G, e ordenados decrescentemente.
- 4. Identifique os cromossomos do grupo A:
- o par A1 é o maior metacêntrico,
- o par A2 é o maior submetacêntrico
- o par A3 é metacêntrico, o maior que sobrou.
- 5. Identifique os cromossomos do grupo B:
- o par B4é o maior submetacêntrico
- o par B5é o maior submetacêntrico menor que o B4

6. Identifique os cromossomos do grupo D:

correspondem aos pares 13,14 e 15. Os três pares são compostos pelos maiores acrocêntricos, faça um contorno em verde ao redor dos cromossomos;

7. Identifique os cromossomos do grupo F:

correspondem aos pares 19 e 20, são os menores metacêntricos, faça um contorno em amarelo ao redor deles;

8. Identifique os cromossomos do grupo G:

correspondem aos pares 21 e 22, que são os menores acrocêntricos, faça um contorno em vermelho ao redor deles. Se o cariótipo pertencer ao sexo masculino, você deverá encontrar mais um cromossomo, o cromossomo Y.

9. Identifique os cromossomos do grupo E:

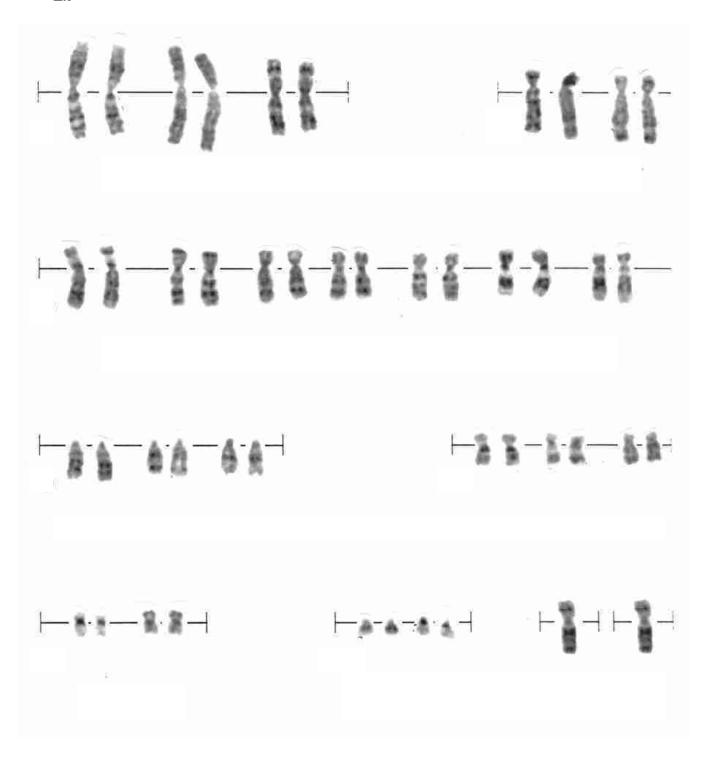
o par E 16 é o menor metacêntrico que restou,

os pares 17 e 18 são os menores submetacêntricos que restaram;

10. Identifique os cromossomos do grupo C:

são todos que restaram correspondem aos pares de 6 a 12, e mais o cromossomo sexual X, se for um indivíduo do sexo masculino haverá um a mais se for do feminino terá dois a mais. Nesse grupo basta apenas contá-los, deixe para separar os pares na hora que você cortá-los.

Ex



Responda:				
O cariótipo preparado corresponde a qual sexo?				
12345				
A B				
-				
6 7 8 9 10 11 12				
C + 2X				
13 14 15 16 17 18				
D E				
19 20 21 22				

F

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º			
Prof.: Data:/			
<i>Tema:</i> Simulação da 1 ^a lei de Mendel			
<i>Material:</i> Recipiente I e II contendo 20 pedras cada um (10 pedras marcadas com a letra A maiúscula e 10 com a letra a minúscula).			
Procedimento:			
1. Sortear uma pedra do recipiente I e outra do recipiente II. Cada pedra corresponderá a um gene dos possíveis gametas, e o par (um de cada recipiente) corresponderá ao zigoto.			
2. Fazer 100 sorteios tomando cautela de repor as pedras e de anotar os resultados.			
3. Preencha a tabela abaixo e responda às questões propostas.			
Indivíduo X Indivíduo Y			
10 A 10 A			
10 a 10 a			
(A) gameta sorteado (a) gameta sorteado			
(A a) zigoto formado			
Probabilidades			
Grupo I			
Grupo II			
Grupo III			
Grupo VI			

Grupo V

Total Absoluto
Total Relativo
Responda:
1. Em que princípio baseia-se a primeira Lei de Mendel?
2. O resultado esperado, foi o obtido? Justifique.
3. Se A condicionasse um gene dominante e a um recessivo, qual a porcentagem fenotípica obtid no final dessa experiência?

ROTEIRO PRÁTICO DE BIOLOGIA N.º

Prof.:	Data:	/

Tema: Estudo dos tecidos animais

Material: Lâminas prontas, M.O.C., óleo de imersão.

Procedimento:

Leia o texto abaixo, esquematizando o que se pede nos aumentos determinados pelo professor.

Os animais possuem em sua organização 4 tipos básicos de tecidos.

- 1. *Tecido* epitelial: é constituído por células de forma regular encostadas umas às outras com função de revestimento e secreção. Utilize uma lâmina de intestino para conhecer esse tipo de tecido.
- 2. *Tecido* de *sustentaçã*o: que é subdividido em vários tipos, sendo esta divisão referente ao material que se localiza entre as células do tecido, como segue.

P conjuntivo, para preencher espaços no organismo.

P adiposo, constituído por células que armazenam gordura.

P hematopoiético, é o que produz as células do sangue.

P cartilaginoso, o material entre as células é consistente.

P ósseo, o material entre as células é rígido. Este tipo de tecido, você vai conhecer observando lâminas de articulação de joelho onde aparecem cartilagem e osso.

- 3. *Muscul*ar: Este tecido é constituído por células alongadas, cuja característica principal e a capacidade de contração. Você irá conhecê-lo observando lâminas do coração.
- 4. *Nervos*o: é constituído por células com abundante prolongamento especializados em receber estímulos e transmitir impulsos. Esse tecido tem função de coordenação e será observado na lâmina do cérebro.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed., Porto Alegre: ARTMED, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DE ROBERTIS, E.D.P., DE ROBERTIS, E.M.F. *Bases da Biologia Celular e Molecular*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.